

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik

Direktor: Prof. Dr. H. Renz

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH , Standort Marburg

***Regulatorische Einflüsse probiotischer Bakterien auf allergische
Immunantworten***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
Doctor medicinae (Dr. med.)



dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Marcel Hennen
aus Leverkusen

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 26.02.2009.

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: PD Dr. Garn

1. Korreferent: Prof. Dr. Dr. Bals

Wer im Geringsten treu ist,
der ist auch im Großen treu
und wer im Geringsten unrecht ist,
der ist auch im Großen unrecht

(Lukas 19, 17)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	07
1.1 Pathophysiologische Grundlagen allergischer Erkrankungen	09
1.1.1 Differenzierung und Bedeutung der verschiedenen T-Lymphozyten	09
1.1.2 Entwicklung und Interaktion von TH ₁ - und TH ₂ -Lymphozyten	10
1.1.3 Auswirkungen einer TH ₂ -gewichteten Immunantwort nach Allergenkontakt	12
1.2 Die Hygienehypothese	15
1.2.1 Wirkungen von Mikroorganismen auf das angeborene Immunsystem	15
1.2.2 PAMPs und deren protektiven Eigenschaften bei Allergien	17
1.2.3 Kritische Periode der Manifestation einer TH ₁ /TH ₂ Balance	17
1.2.4 Pränatale Einflüsse auf die Allergieentstehung	18
1.3 Probiotika zur Prävention von Allergien	19
1.3.1 Lösliche Produkte von LGG als wirksame Substanzen	21
1.4 Mausmodell	21
1.5 Fragestellung	22
2. Material und Methoden	24
2.1 Versuchstiere	24
2.2 Mausmodell der perinatalen Immunmodulation	24
2.2.1 Maternale Behandlung	24
2.2.2 Behandlung der Maus-Nachkommen zur Induktion des experimentellen allergischen Asthma bronchiale	25
2.3 Gewinnung von Serumproben	26
2.4 Head-out Body-Plethysmographie zum Nachweis einer Atemwegshyperreagibilität	26
2.5 Präparation der Versuchstiere, Gewinnung und Analyse der BAL	28
2.5.1 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Differenzierung der BAL	28
2.6 Präparation der Lungen, Anfertigung histologischer Präparate	29
2.7 Ex-vivo stimulierte Cytokinproduktion der Milzzellen	31
2.7.1 Herstellung einer Milzzellsuspension	31
2.7.2 Separation der mononucleären Milzzellen durch Dichtegradienten-Zentrifugation	31
2.7.3 Ex-vivo-Stimulation der mononucleären Milzzellen	32
2.8 Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	32

2.8.1	Zytokinbestimmung in den Milzzellüberständen und der BAL mittels ELISA	33
2.8.2	Konzentrationsbestimmung von Serumimmunglobulinen	35
2.9	Zelllinien und Kultivierung von Zellen	36
2.9.1	Makrophagenzelllinie	36
2.9.2	Kultivierung der Makrophagenzelllinie	36
2.9.3	Stimulation der RAW-Makrophagenzelllinie mit LGG _M	37
2.9.3.1	DNase Behandlung von LGG _M	37
2.9.3.2	Behandlung des LGG _M mit Proteinase K	38
2.9.4	Nachweis von IL-10, IL-6 und TNF- α auf mRNA-Ebene	40
2.9.4.1	RNA-Isolierung aus RAW-Zellen	40
2.9.4.2	Verdau der DNA	41
2.9.4.3	Reverse Transkription	41
2.9.4.4	Quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
2.10	Statistische Auswertung	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	In vivo-Studien	44
3.1.1	OVA-spezifische Antikörper	44
3.1.2	Analyse BAL	45
3.1.2.1	Leukozyten in der BAL	46
3.1.2.2	Interleukin-5-Konzentration in der BAL	47
3.1.3	Lungenhistologie	48
3.1.4	Head-out Body-Plethysmographie	50
3.1.5	Zytokinmuster nach in vivo Stimulation mononukleärer Zellen aus der Milz	50
3.2	In vitro-Studien	52
3.2.1	Cytokinproduktion nach Behandlung mit LGG _M	52
3.2.2	DNase-Behandlung des LGG _M	53
3.2.2.1	Zytokinproduktion von RAW-Makrophagen nach Behandlung mit DNA-freiem LGG _M (LGG _M /ØDNA)	54
3.2.3	Proteinasebehandlung des LGG-konditionierten Zellkulturmediums	55
3.2.3.1	Zytokinproduktion von RAW-Makrophagen nach Behandlung mit Protein-freiem LGG _M (LGG _M /ØProtein)	56
3.2.4	RNA-Isolierung aus mit LGG _M und LGG _M /ØProtein behandelten RAW-Makrophagen	57

4.	Diskussion	59
4.1	Effekte des LGG _M auf die Entwicklung von Immunantworten in den Nachkommen	60
4.2	Differenzierung von immunmodulatorisch wirksamen Bestandteilen des LGG _M	64
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblicke	66
5.	Literaturverzeichnis	68
6.	Abkürzungsverzeichnis	76
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	78
8.	Zusammenfassung	80
9.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	81
10.	Curriculum vitae	82
11.	Danksagung	83
12.	Ehrenwörtliche Erklärung	84

1. Einleitung

Clemens von Pirquet prägte im Jahr 1906 erstmals den Begriff „Allergie“ [allos (griech.) = andere; ergon (griech.) = Wirkung] und definierte ihn als „eine veränderte Fähigkeit des Körpers auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“, wobei die Änderungen der Reaktionsfähigkeit nicht nur von äußeren, sondern auch von organismuseigenen Faktoren abhinge (Huber, 2006). Diese Grundidee spiegelt sich noch in dem heutigen Verständnis von „Allergie“ wider: Es handelt sich um eine Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird. Es liegt also eine Hypersensibilität des Organismus vor.

Zu dem allergischen Formenkreis zählen unter anderem das atopische Ekzem, die allergische Rhinokonjunktivitis, allergische Darmentzündungen, oder, als potentiell lebensgefährliche Form, das allergische Bronchialasthma bzw. der anaphylaktische Schock.

Allergische Erkrankungen zeigten in den industrialisierten Ländern in den letzten Jahrzehnten einen deutlichen Anstieg der Prävalenz. Verantwortlich hierfür ist unter anderem die noch immer steigende Inzidenz von Allergien besonders bei Kindern (Maziak, 2003). Mit einer Prävalenz von 15% in Deutschland sind Allergien hier die häufigste chronische Erkrankung in dieser Altersgruppe.

Es lässt sich in diesem Zusammenhang ein deutlicher Unterschied zwischen einzelnen Staaten Europas aufzeigen (siehe Abb.1): Während Großbritannien mit einer Prävalenz von durchschnittlich über 20% die Spitze markiert, zeigen sich in fast allen osteuropäischen sowie den Balkanstaaten Prävalenzen von unter 5%. (ISAAC, 1998)

Auch in Deutschland war ein Ost-West-Unterschied zu beobachten Während in dem Beobachtungszeitraum 1997/98 in Westdeutschland die Prävalenz von Heuschnupfen bei 17% lag, waren es im Osten nur 11% (Bundes-Gesundheitssurvey 1998).

Neben den regionalen Unterschieden spielt auch die soziale Stellung eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Allergien: Während Kinder sozial höher eingestufte Eltern signifikant häufiger an Allergien erkranken, zeigen Kinder von sozial niedriger eingestuften Eltern deutlich geringere Erkrankungsraten (Heinrich et al, 1998).

Im Hinblick auf den häufig progredienten Verlauf von Allergien, z.B. durch die Ausbildung eines Asthma bronchiale und die oft lebenslange Persistenz, belastet diese Erkrankung auch in erheblichem Maße das Gesundheitssystem (Smith et al., 1997).

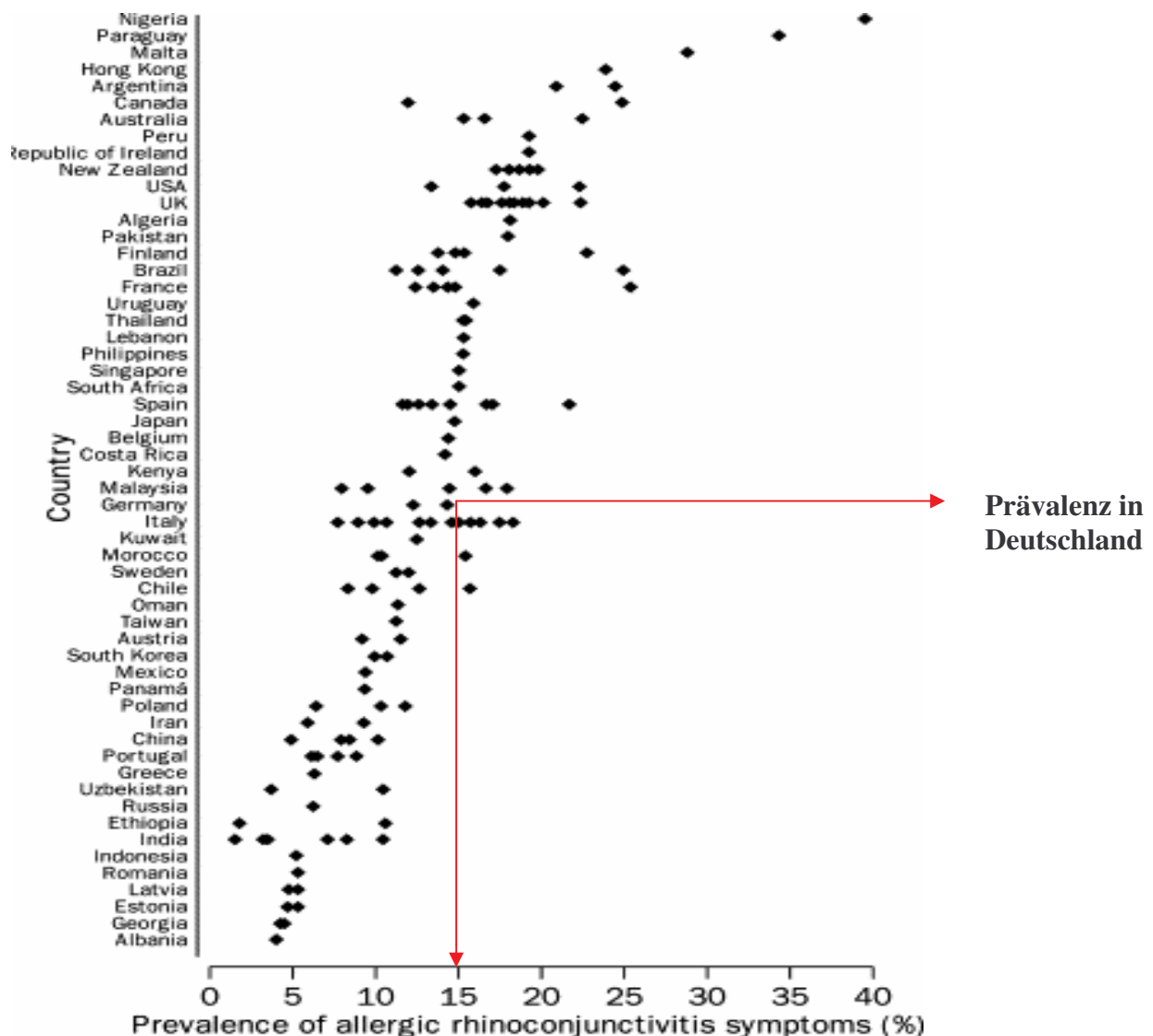


Abbildung (Abb.) 1: Ein-Jahres-Prävalenz asthmatischer Symptome in 13-14-jährigen Jugendlichen Während in den osteuropäischen Staaten Prävalenzen um 5% herrschen, zeigen sich in westlichen bereits Prävalenzen um 20 % wie z.B. in Großbritannien (Nach: World wide variation in prevalence in asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. Lancet 1998; 351: 1225-32)

Die Ursachen für die Entstehung von Allergien sind vielfältig. Diskutiert werden u.a. bestimmte Umweltfaktoren wie auch genetische Prädispositionen bei bereits manifesten allergischen Erkrankungen in der Familie: So ist z.B. das Risiko Asthma zu entwickeln bei Kindern mit mindestens einem an Asthma erkranktem Elternteil signifikant erhöht (Burke et al., 2003).

Auch werden die in Industrienationen vorherrschenden hygienischen Verhältnisse für die gesteigerte Inzidenz verantwortlich gemacht, welche auch mit dem sozialen Status korrelieren: Während z.B. 12% der Kinder aus Bauernfamilien allergische Erkrankungen aufweisen, zeigen bereits 29% der Kinder aus nicht bäuerlichen Familien eine allergische Erkrankung (Riedler et al., 2001).

Als mögliche weitere Umweltfaktoren werden vor allem die nach wie vor zunehmende Umweltverschmutzung, veränderte Allergenkonzentrationen, Veränderungen bei der Ernährung, sowie die veränderte Exposition durch Infektionskrankheiten in der frühen Kindheit diskutiert.

Die Forschung beschäftigt sich aktuell auch mit den prä- und frühen postnatalen Einflüssen auf die Induktion von Allergien im frühen Kindesalter und das sich noch in der Entwicklung befindlichem Immunsystem. So können die maternale Immunitätslage und die in der frühen Kindheit vorherrschenden Umwelteinflüsse grundlegenden Einfluss auf die Manifestation von Allergien in dem sich entwickelndem kindlichen Organismus nehmen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit diesem Thema insofern, als dass geprüft werden soll, ob eine gezielte Ernährung während der Schwangerschaft die Toleranzmechanismen der Nachkommen beeinflussen kann.

1.1 Pathophysiologische Grundlagen allergischer Erkrankungen

1.1.1 Differenzierung und Bedeutung der verschiedenen T-Lymphozyten

Eine zentrale Bedeutung innerhalb der Immunpathogenese von Allergien kommt den CD4-positiven T-Lymphozyten zu. Diese so genannten T-Helferzellen (TH-Zellen) können anhand des von ihnen produzierten Zytokinmusters weiter eingeteilt werden. So lassen sich heute mindestens vier polarisierte Subpopulationen unterscheiden:

T-Helfer-1-Zellen (TH₁-Zellen) produzieren typischerweise IL-2, IFN- γ und TNF- α . T-Helfer-2-Zellen (TH₂-Zellen) zeigen als Leitzytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 und GM-CSF. T-Helfer-3-Zellen (TH₃-Zellen) sezernieren hauptsächlich TGF- β als Hauptzytokin. T-Helfer-17-Zellen (TH₁₇-Zellen) produzieren IL-17 (Mosman et al., 1986 ; Paul et al., 1994).

Während die TH₁-Zellen durch die Sekretion „ihrer“ Zytokine vor allem eine zelluläre, durch Neutrophile Granulozyten dominierte entzündliche Reaktion hervorrufen, wird bei der TH₂-Antwort eine humorale Kaskade in Gang gesetzt. Bei dieser, durch eosinophile Granulozyten dominierten Entzündung, werden B-Lymphozyten zur Proliferation, Differenzierung und Immunglobulinproduktion angeregt (Constant and Bottomly, 1997). Die TH₃-Zellen haben ihre besondere Bedeutung in der Aufrechterhaltung von Toleranz gegenüber präsentierten Antigenen. TH₁₇-Zellen induzieren über IL-17 in den Zielzellen wiederum eine Sekretion von G-CSF, IL-6 und IL-8 und somit eine durch Neutrophile Granulozyten dominierte Entzündung..

Allergische Erkrankungen werden heute als Resultat einer durch TH₂-Zellen dominierten Immunantwort gesehen. Es besteht hierbei ein Ungleichgewicht des Verhältnisses zwischen TH₁- und TH₂-Zellen (Robinson, 2000). So wurden z.B. in den bronchioalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit allergischem Asthma im Vergleich zur BAL gesunder Patienten, deutlich erhöhte Konzentrationen für IL-4 und IL-5, jedoch keine Erhöhung von IFN- γ gefunden (Robinson et al., 1992).

1.1.2 Entwicklung und Interaktion von TH₁- und TH₂-Lymphozyten

Ausgehend von einer gemeinsamen Vorläuferzelle, dem naiven, aus dem Thymus stammenden CD4-positiven T-Lymphozyten (TH₀), entwickeln sich die T-Helferzellen durch das Einwirken exogener Faktoren grundlegend unterschiedlich (siehe Abb.2).

Den Grundstein für diese Entwicklung legen vor allem die Dendritischen Zellen (DC) (Lambrecht, 2001): Sie sind als antigenpräsentierende Zellen dafür verantwortlich, die naiven T-Lymphozyten über eine Interaktion ihres Allergenpeptid-MHC-II-Komplexes mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) dieser zu stimulieren. Es entsteht zunächst eine T-Helferzelle, die noch in der Lage ist, sowohl TH₁- als auch TH₂-typische Zytokine zu bilden (Firestein, 1989). Die Frage, welche Faktoren nun eine Differenzierung hin zur spezifisch zytokinproduzierenden TH-Zelle bewirken ist im Detail noch nicht geklärt. Allerdings sind verschiedene Einflüsse identifiziert worden:

So entstehen unter dem Einfluss hoher Allergendosen bevorzugt TH₁-Zellen, während niedrige Dosen die Entstehung von TH₂-Zellen fördern. Auch hohe Konzentrationen von IL-12 und INF- γ , sowie niedrige IL-10-Spiegel bedingen eine Förderung von TH₁-Zellen (Hsieh, 1993). Niedrige IL-12- und hohe IL-4-Konzentrationen im Besonderen, aber auch IL-6 und IL-10 fördern hingegen die Entstehung von TH₂-Zellen (Seder and Paul, 1994).

Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang auch, dass die reifen TH-Zellen selbst die zu ihrer Differenzierung notwendigen Zytokine bilden. So vermag eine TH₁-Zelle durch die Produktion von IFN- γ die weitere TH₁-Bildung zu fördern und gleichzeitig die TH₂-Induktion zu verhindern. Gleiches gilt umgekehrt für die TH₂-Zellen, wobei hier das von ihnen gebildete IL-4 die entscheidende Rolle übernimmt. (Cousins et al., 2002)

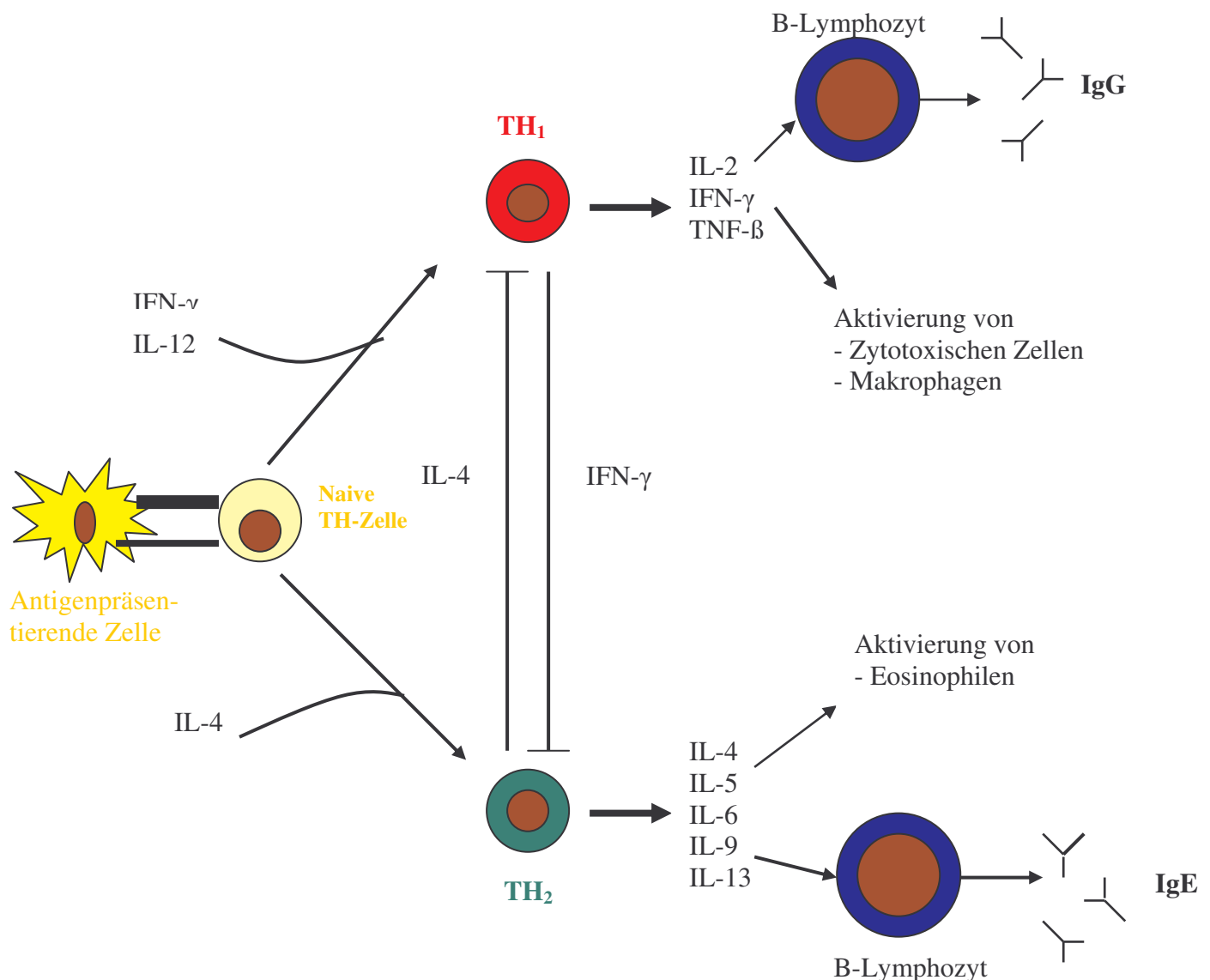


Abb. 2: Bildung und Funktion der TH-Zellen: Nach dem Antigen-TCR-Kontakt entscheidet vor allem das vorherrschende Zytokinmilieu über die weitere Entwicklung der naiven TH-Zelle. Während IL-4 die Entwicklung hin zur TH₂-Zelle fördert und gleichzeitig die TH₁-Bildung unterdrückt, fördern IFN- γ und IL-12 die Bildung von TH₁-Zellen bei gleichzeitiger Unterdrückung von TH₂-Zellen. Auch gezeigt sind die für die polarisierten TH-Zellen typischen Zytokinmuster mit den daraus resultierenden immunologischen Konsequenzen. (Modifiziert nach Abbas et al., 1996)

Darüber hinaus haben unter anderem auch der Grad der Affinität zwischen Antigen und TCR (je höher, umso eher entstehen TH₁-Zellen) und die Art der antigenpräsentierenden Zellen Einfluss auf die Differenzierung. (Constant and Bottomly, 1997; Kalinski et al., 1999).

1.1.3 Auswirkungen einer TH₂-gewichteten Immunantwort nach Allergenkontakt

Hat eine TH₂-induzierende Sensibilisierung des Organismus durch wiederholte Allergenkontakte stattgefunden, wobei APCs die Allergene phagozytieren, prozessieren und schließlich über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren, kommt es zunächst zu einer TH₂-Aktivierung mit entsprechender Ausschüttung von spezifischen Zytokinen wie IL-4 und IL-13. Diese führen zu einer Aktivierung von B-Lymphozyten mit einem bevorzugtem IgE-Isotypenswitch (siehe Abb.3). Das sezernierte IgE bindet nun an IgE-Rezeptoren von basophilen Granulozyten und Mastzellen, wodurch diese sensibilisiert werden.

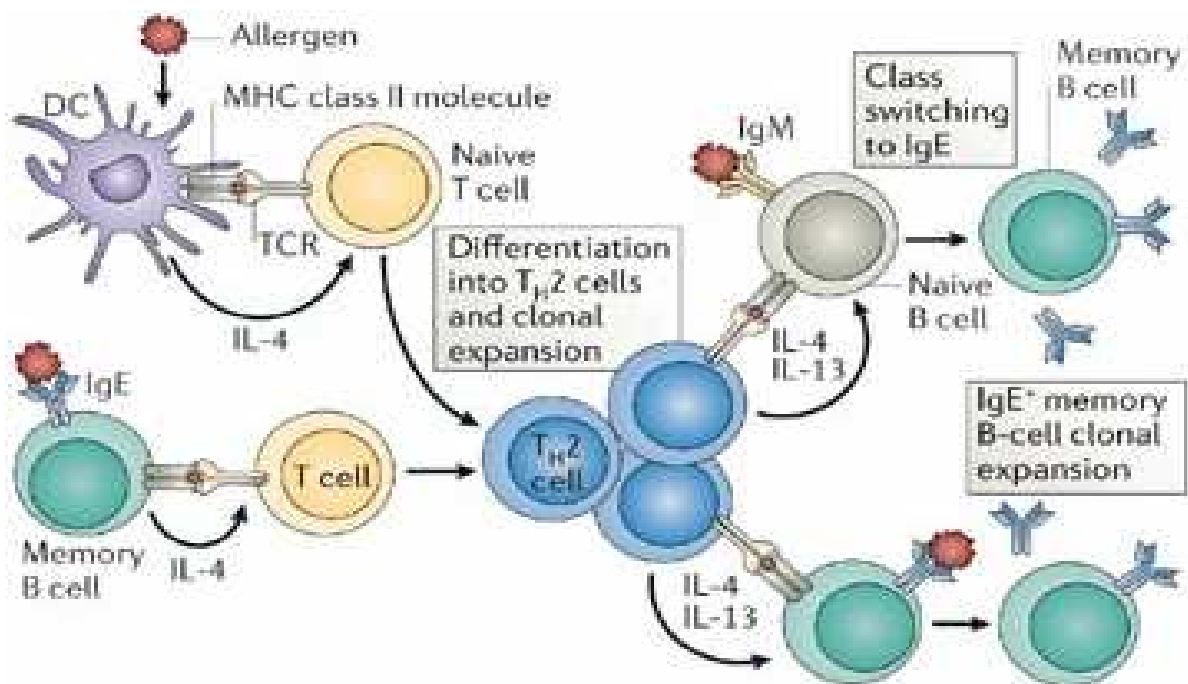


Abb. 3: Sensibilisierung und Entwicklung spezifischer B- und TH-Lymphozyten: Nach dem Allergenkontakt präsentieren die APCs diese schließlich über MHC-Klasse-II-Moleküle an naive TH-Zellen. Es folgt eine Differenzierung hin zu TH₂-Zellen mit spezifischer Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-13. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung von B-Lymphozyten mit einem bevorzugtem IgE-Isotypenswitch und anschließender Sekretion von IgE. (Nach: Larche et al., Nature Reviews/Immunology, Vol. 6, Okt. 2006, p. 763)

Kommt es nun erneut zu einem lokalen Allergenkontakt über die sensibilisierten Mastzellen bzw. die basophilen Granulozyten, werden toxische Mediatoren wie z.B. Histamin und Prostaglandine ausgeschüttet. Hierdurch wird u.a. die Gefäßpermeabilität erhöht und Kontraktionen der glatten Muskulatur gefördert (Gurish et Austen, 2001). Da diese Entzündungsreaktion sofort nach Allergenkontakt stattfindet, wird sie auch als eine allergische Reaktion vom „Soforttyp“ bezeichnet (siehe Abb. 4).

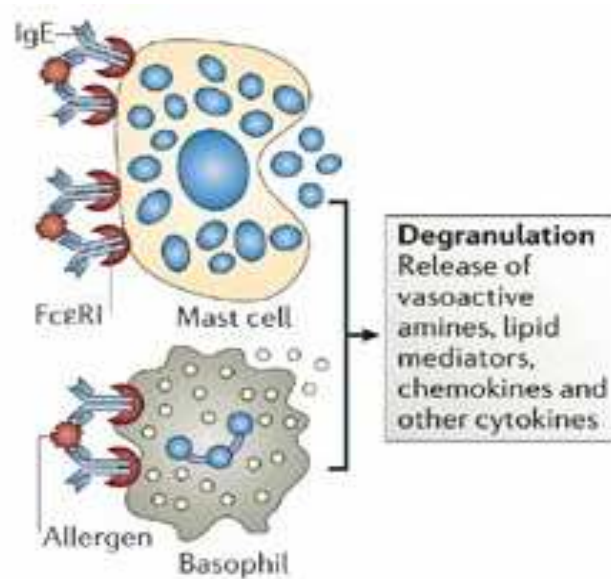


Abb. 4: Reaktion vom Soforttyp: Wenn eine Kreuzvernetzung von den auf Mastzellen und basophilen Granulozyten gebundenen IgE-Molekülen durch Allergene stattfindet, kommt es zu einer Freisetzung von verschiedensten Mediatoren wie etwa vasoaktiven Aminen, Lipiden oder anderen Zytokinen (Nach: Larche et al., Nature Reviews/Immunology, Vol. 6, Okt. 2006, p. 763).

Die zweite Reaktion, die sogenannte „Spätphasereaktion“ (siehe Abb. 5) ist u.a. durch anhaltende Kontraktionen der glatten Muskulatur, Ödeme und Überreaktionen z.B. der Atemwege auch auf unspezifische bronchokonstriktorische Stimulanzen (z.B. Methacholin, aber auch Kälte und Feuchtigkeit) sowie massiven Entzündungsvorgängen klinisch gekennzeichnet. Zu dieser Reaktion kommt es einerseits, wenn durch lokale fortbestehende Antigenpräsentation durch APCs die TH₂-spezifische Kaskade weiter aufrecht erhalten wird und es somit zu einer massiven Stimulation des inflammatorischen Systems kommt. Hierbei spielt das hauptsächlich von TH₂-Zellen produzierte IL-5 eine wichtige Rolle: Hierdurch

werden neben weiteren B-Lymphozyten und TH₂-Zellen v.a. auch eosinophile Granulozyten zum Entzündungsherd mobilisiert (Galli et al., 2005; Cieslewicz et al., 1999). Andererseits führt die Aktivierung von Mastzellen und Basophilen Granulozyten zu einer protahierten allergischen Entzündung u.a. durch die Ausschüttung von Leukotrienen und Histamin, die zeitversetzt Phagozyten und weitere inflammatorische Zellen anlocken. Besteht der Allergenkontakt schließlich längerfristig, so kann die Spätphasereaktion leicht in ein chronisch-entzündliches Krankheitsbild, teilweise mit massiven pathologischen Umbauvorgängen verbunden, übergehen (Rosenwasser 2007).

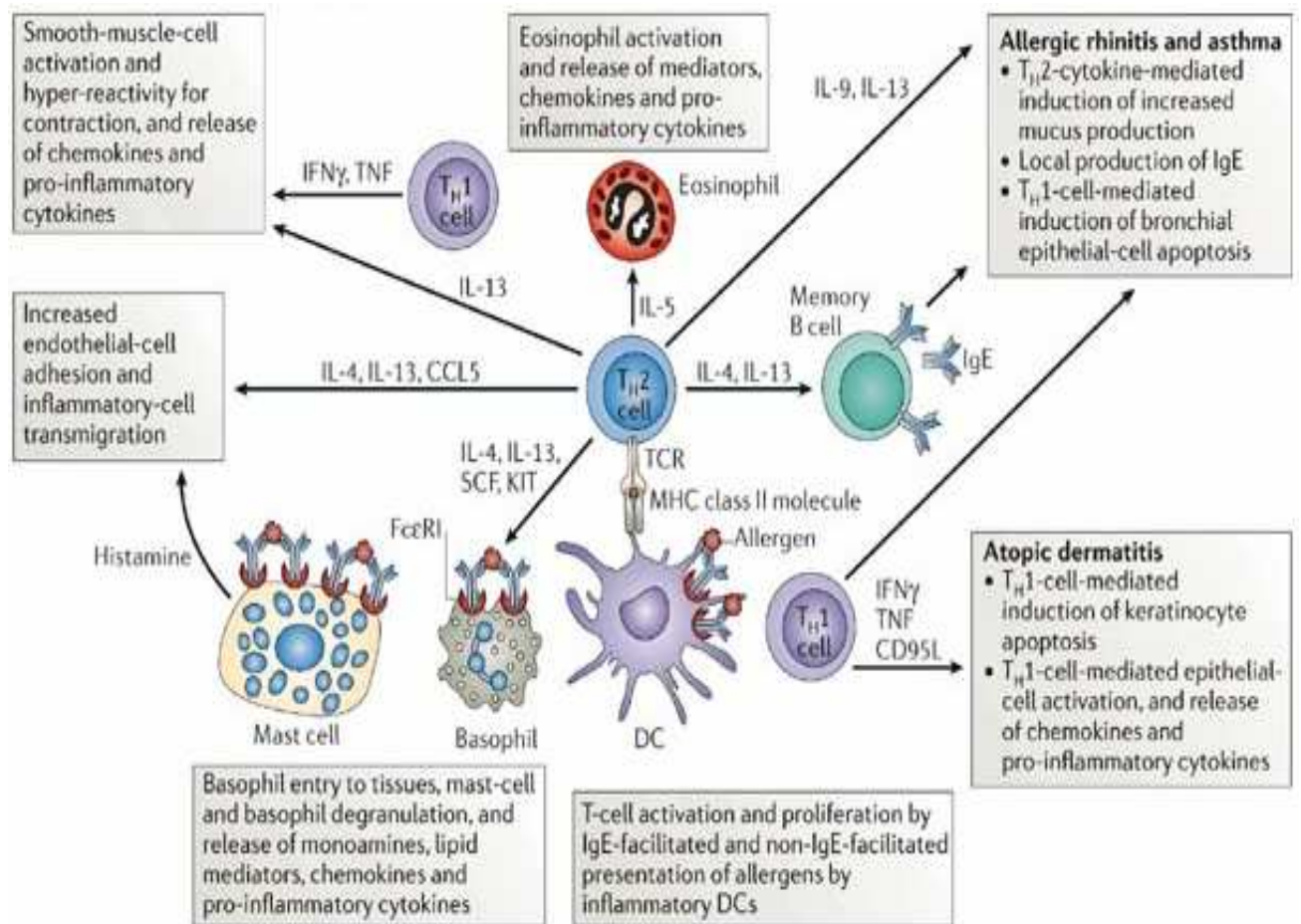


Abb. 5: Reaktion vom Spättyp: Bei der Reaktion vom Spättyp steht v.a. eine durch eosinophile Granulozyten bedingte Entzündung im Vordergrund. Verantwortlich für diese Reaktion ist u.a. die chemotaktische Wirkung des von TH₂-Zellen produzierten IL-5. Protahiert wird diese Reaktion durch die stete Aufrechterhaltung der Allergenpräsentation durch APCs. (Nach: Larche et al., Nature Reviews/Immunology, Vol. 6, Okt. 2006, p. 763).

1.2 Die “Hygienehypothese”

Die Hygienehypothese besagt, dass eine generell verminderte Exposition gegenüber Mikroorganismen, wie sie im täglichen Leben physiologisch in Erscheinung treten, zu einer erhöhten Prädisposition für Allergien führt. Bereits 1989 beobachtete Strachan, dass unhygienische Lebensverhältnisse und hieraus resultierende Infektionen besonders im Kindesalter die Entwicklung von Allergien zu mindern scheint (Strachan, 1989). Es folgten zahlreiche weitere epidemiologische Studien, die einen Zusammenhang zwischen den hygienischen Verhältnissen bzw. dem Ausmaß der Exposition mit Umweltkeimen und deren Konsequenz auf die Entwicklung von Allergien aufzeigen konnten:

So konnte nachgewiesen werden, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufwuchsen und somit einer wesentlich höheren Exposition durch mikrobiologische Komponenten ausgesetzt waren als die Kinder aus nicht-bäuerlichen Verhältnissen, ein vermindertes Risiko zur Entwicklung von Allergien besaßen (Riedler et al. 2001; Braun-Fahrlander, 1999). Auch ein großer Viehbestand in der Nähe zum Wohnhaus zeigte einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung von Allergien (Von Ehrenstein et al., 2000; Kipelainen et al., 2000).

Auch scheint ein hoher Lebensstandard, der meist direkt mit hygienischeren Lebensverhältnissen korreliert, einen entscheidenden Faktor bei der steigenden Zahl an allergischen Erkrankungen zu spielen. So konnten Untersuchungen zeigen, dass in Ostdeutschland vor 1990 signifikant weniger Allergien zu verzeichnen waren als in Westdeutschland (Nowak et al. 1996). Mit Anpassung der Lebensstandards nach der Wiedervereinigung sollte also eine steigende Prävalenz an allergischen Erkrankungen zu verzeichnen sein. Diese Vermutung konnten Heinrich et al. 2002 schließlich beweisen: Die Prävalenz für Heuschnupfen, Atopisches Ekzem und Asthma stieg in Ostdeutschland bei Kindern, die nach 1990 geboren wurden, signifikant (Heinrich et al. 2002).

1.2.1 Wirkungen von Mikroorganismen auf das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt eine wichtige Barriere zum Schutz vor potentiell pathogenen Mikroorganismen dar. Toll-like-Rezeptoren (TLRs) antigenpräsentierender Zellen spielen hierbei eine entscheidende Rolle: Die Aktivierung des Systems erfolgt nämlich durch die Interaktionen von bakteriellen bzw. viralen „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs), wie z.B. Peptidoglykanen, DNA, Flagellin oder Proteinen mit den TLRs. Es

existieren verschiedene TLRs, die jeweils spezifisch durch ein bestimmte PAMPs aktiviert werden (Bauer et al. 2007), siehe Tabelle 1:

Tabelle 1: TLRs und durch sie erkannte PAMPs: Bindet der mikrobielle Ligand an seinen spezifischen Rezeptor wird eine Kaskade aktiviert, an dessen Ende die Sekretion von Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen steht. (Nach: Bauer et al., Immunobiology, 2007, Vol 212, pp. 521-533)

Receptor	Ligand
TLR1/TLR2	Triacyl lipopeptide
TLR2	Lipoprotein/lipopeptide, Lipoteichoic acid, Glycoinositol-Hemagglutinin, Structural viral proteins, <i>Endogenous ligands: Gp96, Hsp60, Hsp70, Hyaluronic acid, HMGB1</i>
TLR3	Double-stranded RNA
TLR4	Lipolysaccharide, RSV fusion protein, MMTV envelope protein, <i>Endogenous ligands: Gp96, Hsp60, Hsp70, Hyaluronic-acid, Heparan sulphate, Fibronectin, Fibrinogen, Surfactant protein A, HMGB1, beta-defensin</i>
TLR 5	Flagellin
TLR6/TLR2	Diacyl lipopeptides
TLR 7	Imidazoquinoline, loxoribine
TLR 8	Imidazoquinoline, ss RNA
TLR 9	CpG-containing DNA
TLR10	?
TLR11	Profilin
TLR12/13	?

Folge dieser Aktivierung ist eine Kaskade, an deren Ende u.a. die Sekretion von IFN- γ , IL-1, IL-6, TNF- α und weiteren verwandten proinflammatorischer Zytokinen steht, die v.a. zu einer Aktivierung von TH₁-Zellen beitragen (Vandenbulcke et al., 2006; Kaisho, 2006; Wagner, 2001).

1.2.2 PAMPs und deren protektiven Eigenschaften bei Allergien

Wie bereits erwähnt führt die Aktivierung von TLRs zu einer proinflammatorischen, TH₁-gewichteten Immunantwort. Ausgehend von der Hypothese, dass die Balance zwischen TH₁ und TH₂ bei Allergien zugunsten einer überschüssigen TH₂-Antwort verschoben ist, kommt den TH₁-aktivierenden PAMPs eine bedeutende Rolle als „ausgleichende“ Kraft zu.

Diese Grundidee spiegelt sich auch in der Hygienehypothese wider: Kinder, die z.B. auf Bauernhöfen stets in engem Kontakt zu Mikroorganismen stehen, entwickeln signifikant weniger Allergien. Das Immunsystem dieser Kinder wird also in Richtung TH₁-Antwort verschoben. Studien konnten z.B. nachweisen, dass Kinder von Bauernhöfen eine deutlich erhöhte Expression von TLR-2-mRNA bei gleichzeitig verminderter Entwicklung von Allergien zeigten (Lauener et al., 2002). Weiter hat sich herausgestellt, dass Patienten mit Infektionserkrankungen, wie etwa Hepatitis A, Masern oder Tuberkulose, eine deutlich verminderte Prävalenz allergischer Erkrankungen zeigten (Rook et al. 2007; Von Mutius et al., 2000).

Auch auf therapeutischer Ebene spielen PAMPs bei Allergien eine zunehmend wichtige Rolle: CpG-DNA als TLR-9-Ligand war z.B. eine der ersten Substanzen, die einen protektiven Effekt im Tierversuch nachweisen konnte: TH₂-sensibilisierte Mäuse zeigten in einem Allergiemodell nach Verabreichung von CpG-DNA deutlich weniger allergische Reaktionen wie Asthma oder Rhinokonjunktivitis (Horner et al. 2001). Auch wurde CpG-DNA mittlerweile auf humaner Ebene mit Erfolg zur Behandlung von Allergien getestet (Simons et al. 2004).

Bakterielles LPS als typischer TLR-4-Ligand zeigte bei hoher Dosierung im Tierversuch ebenfalls eine deutliche Reduzierung allergiespezifischer Symptome wie etwa die Serumkonzentration von IgE oder die Zahl der eosinophilen Granulozyten in den Lungen. Allerdings zeigte sich weiter, dass die Zahl der neutrophilen Granulozyten in den Lungen stieg, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese des nicht-atopischen Asthmas spielen (Goldmann, 2007).

1.2.3 Kritische Periode der Manifestation einer TH₁/TH₂ Balance

Das Immunsystem von Kindern zeigt in den ersten 6 Monaten eine physiologische TH₂-Dominanz, die allmählich abnimmt (Prescott 1999). Bei allergischen Kindern jedoch findet

diese Abnahme nicht statt (Wills-Karp et al., 2001). Ursächlich hierfür könnte eine verminderte Interaktion von PAMPs mit TLRs sein, die u.a. durch die gestiegenen hygienischen Verhältnisse in den westlichen Industrienationen mit entsprechend reduziertem Kontakt zu Mikroorganismen erklärt wird: Die TH₂-Dominanz wird durch die normalerweise stetig steigende TH₁-Antwort zugunsten einer ausgeglichenen TH₁/TH₂ Balance zurückgedrängt (Kidd, 2003). Fehlt dieser immunologischer Anreiz, persistiert die TH₂-Dominanz mit entsprechender Neigung zur Entwicklung allergischer Erkrankungen (Romagnagi, 2004).

Riedler et al. konnten nachweisen, dass Kleinkinder, die bereits vor dem ersten Lebensjahr unpasteurisierte Milch tranken und sich im Stall aufhielten, also in einer Phase, in der sich das TH₁/TH₂ Gleichgewicht noch nicht manifestiert hat, signifikant weniger Allergien entwickelten, als ältere Kinder nach dem 1. Lebensjahr (Riedler et al. 2001).

Ähnliche Beobachtungen konnten auch auf klinischer Ebene gemacht werden: Therapien mit probiotischen Bakterien zeigten sowohl in der Prävention, als auch in der Behandlung von bereits manifesten allergischen Erkrankungen nur Erfolge, sofern sie zu einem frühen Lebensalter begonnen wurden (Feleszko al. 2007; Wang et al. 2004; Helin et al. 2002; Majama et Isolauri 1997).

1.2.4 Pränatale Einflüsse auf die Allergieentstehung

Es gibt viele Hinweise dafür, dass es bereits intrauterin zu einer Einflussnahme auf das kindliche Immunsystem kommt: Riedler et al. konnten beobachten, dass Kinder von Müttern, die während der Schwangerschaft weiterhin Stallarbeit verrichteten, signifikant weniger an Asthma litten (Riedler et al. 2001).

Auch zeigen einige Studien, dass Kinder von Müttern, die pränatal mit probiotisch wirksamen Substanzen substituiert wurden, von einem protektivem Effekt in Bezug auf die Entwicklung von Allergien profitierten: Kalliomäki et al. konnte 2001 nachweisen, dass eine Substitution mit Milchsäurebakterien die Prävalenz von Atopischen Ekzemen reduzierte (siehe auch Abschnitt 1.4). Eine weitere Studie zeigte, dass Kinder, deren Mütter in der Schwangerschaft strikt den Kontakt mit Hausstaub(milben) mieden, eine deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung einer Hausstaub(milben)-Allergie aufwiesen (Woodcock et al., 2004).

Auch in Tierexperimenten konnte eine pränatale Einflussnahme auf das Immunsystem der Nachkommen beobachtet werden: So zeigten die Nachkommen von Ratten, deren Muttertiere

intraperitoneale Injektionen aus Ovalbumin (OVA) in Aluminiumhydroxid erhielten, eine um die Hälfte reduzierte IgE-Antwort nach OVA-Sensibilisierung (Jarrett et Hall, 1984). Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit Mausnachkommen gemacht, deren Muttertiere intraperitoneal wie nasal LPS erhielten: Das Risiko für die postnatale Entwicklung einer Allergie sank signifikant (Blümer et al. 2005).

Blümer et al. konnten in einer weiteren Studie nachweisen, dass die pränatale Supplementierung von Milchsäurebakterien ebenfalls zu einer signifikanten Reduzierung von allergischen Reaktionen in den Mausnachkommen führte (Blümer et al., 2007).

1.3 Probiotika zur Prävention von Allergien

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete *Lactobacillus Goldin und Gorbach* (LGG) gehört zur Ordnung der Gram-positiven Lactobacillaceae. Neben den Lactobacillaceae spielen viele weitere Bakterien als Probiotika (Zubereitungen, die lebensfähige Mikroorganismen enthalten) eine bedeutende Rolle als gesundheitsfördernde Mikroorganismen (Fuller 1989). Auch zur Prävention von Allergien konnte ihnen bereits in Studien sowohl prä- als auch, in geringerem Umfang, postnatal eine präventive Wirkung zugeschrieben werden.

In einer prospektiven Studie wurden Müttern, die entweder selbst, oder deren Partner an einem atopischen Ekzem litten, während der Schwangerschaft LGG-Kapseln verabreicht. Die

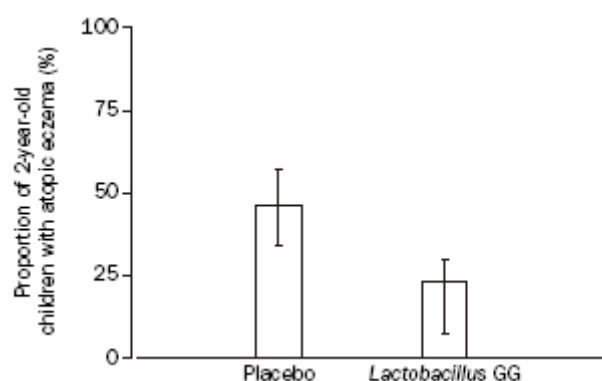


Abb. 6: Behandlungseffekt von LGG bei atopischem Ekzem. Kinder, die sechs Monate ab der Geburt mit LGG behandelt wurden und deren Mütter schon während der Schwangerschaft ebenfalls LGG bekamen, zeigten nach zwei Jahren 50% weniger häufig ein atopisches Ekzem als die Kinder in der mit einem Placebo behandelten Gruppe. (Quelle: Kalliomäki, The Lancet, Vol. 357, April 2001, p.1078)

Kinder, die auf Grund der familiären Belastung stark gefährdet waren, ebenfalls ein atopisches Ekzem zu entwickeln, wurden postnatal weitere sechs Monate mit LGG peroral behandelt.

Die Studie zeigte im Ergebnis, dass die Häufigkeit eines atopischen Ekzems nach zwei Jahren bei Kindern der mit LGG behandelten Gruppe um 50 % niedriger lag (Abb. 6) im Vergleich zu der mit einem Placebo behandelten Kontrollgruppe (Kalliomäki et al., 2001). In einem Follow-up mit dem gleichen Kollektiv nach weiteren 2 Jahren zeigte sich bei fast gleich bleibenden Testergebnissen, dass der protektive Effekt anzuhalten scheint (Kalliomäki et al., 2003).

Eine weitere Studie untersuchte die Wirkung einer oralen LGG-Behandlung an 1 bis 13 jährigen Kindern, die an einer atopischen Dermatitis litten. Sechs Wochen dauerte die Behandlung und im Anschluss wurde eine standardisierte Evaluation erhoben (Besserung, gleich bleibende oder Verschlechterung der Symptomatik), in der 56 % der Patienten mit LGG-Behandlung eine Besserung der Symptomatik angaben (Abb. 7). In der Placebogruppe jedoch gaben nur 15,6 % eine Besserung an. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass sich das ebenfalls gemessene Zytokinprofil (IL-2, -4, -10, IFN- γ) der Kinder in beiden Gruppen nicht unterschied (Rosenfeldt et al., 2003).

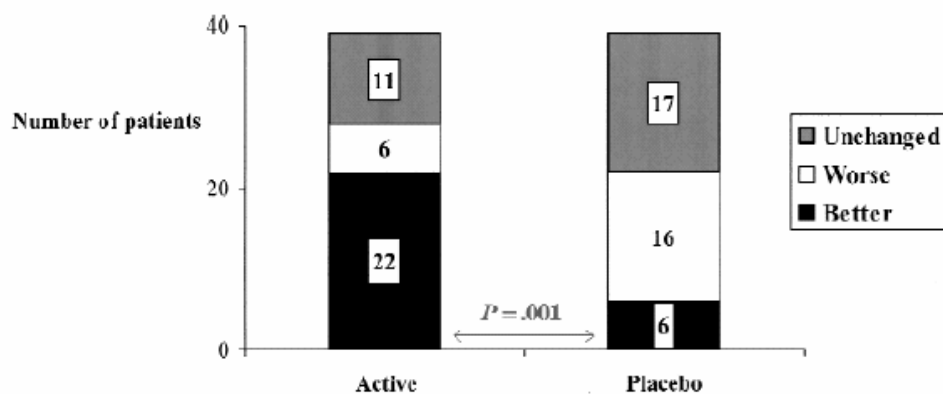


Abb. 7: Erfolgreiche Wirkung einer oralen LGG-Behandlung: Deutlich ist die signifikant höhere Rate an Besserungen der Beschwerdesymptomatik bei Patienten unter LGG-Behandlung im Vergleich zur Placebogruppe zu erkennen. (Quelle: Rosenfeldt, Allergy Clin. Immunol., Vol 111, Feb. 2003, p.392)

Eine ähnliche Studie jedoch sah keine klinischen bzw. immunologischen Effekte bei einer LGG-Supplementierung bei atopischen Kleinkindern, verglichen mit der Placebogruppe (Brouwer et al., 2006). Weiter konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass auch ältere Atopiker (14-36 Jahre), die für insgesamt 5,5 Monate oral mit LGG behandelt wurden, keine signifikanten Unterschiede in der klinischen Symptomatik aufzeigten (Helin et al., 2002).

1.3.1 Lösliche Produkte von LGG als wirksame Substanzen

Einige Studien deuten darauf hin, dass die Wirkung der immunmodulatorischen Effekte des LGG auf lösliche Produkte des Bakteriums zurückzuführen sind (Yan et al., 2007; Pena et Versalovic, 2003).

Welche sezernierten Produkte hierbei genau eine Rolle spielen, ist weitgehend unbekannt. Denkbar wären u.a. beim Absterben der Bakterien freigesetzte Bestandteile, die als PAMPs fungieren und somit die zuvor bereits beschriebenen immunologischen Effekte bewirken könnten. Interessant sind die Ergebnisse von Yan et al. (2007) und Pena et al. (2003) insofern, als dass die Option aufgezeigt wird, bestimmte immunologisch wirksame Zellkomponenten für therapeutische Zwecke zu isolieren und therapeutisch zu verwerten, ohne die Gefahr einzugehen, potentiell pathogene Keime zu verabreichen.

1.4 Mausmodell

Das Immunsystem der Maus ist gut charakterisiert, die wesentlichen immunologischen Mechanismen stimmen, trotz selbstverständlich bestehender Unterschiede mit dem humanem Immunsystem weitgehend überein (Herz, 1996).

Als Modell wurde die BALB/c-Maus gewählt, da dieser Stamm dafür bekannt ist, potentiell eine starke TH₂-Reaktion nach Sensibilisierung z.B. mit Ovalbumin zu entwickeln. Um eine experimentelle, akut-allergische Entzündungsreaktion in den Tieren auszulösen, ist zunächst jedoch die Sensibilisierung des Organismus gegen dieses artfremde Protein zu induzieren. Dies geschieht z.B. durch wiederholte intraperitoneale Applikationen des Ovalbumins in Verbindung mit Aluminiumhydroxid, wodurch es zu einer Ausbildung allergenspezifischer TH₂-Zellen kommt. Gegen das Allergen wird dann bei lokaler Provokation eine allergische

Antwort, etwa eine allergische Entzündungsreaktion in den Atemwegen bei inhalativer Provokation auslöst (Renz, 1993; Herz 1998).

Die vorliegende Studie orientiert sich bei der Auswahl des Mausmodels eng an dem von Blümer et al. verwendeten, da hiermit bereits nachgewiesen werden konnte, dass die Nachkommen von BALB/c-Mäusen, die perinatal insgesamt 25 intragastrische LGG-Injektionen verabreicht bekamen, signifikante Unterschiede in der Entwicklung von Allergien zeigten (Blümer, 2007).

1.5 Fragestellung

Allergien sind chronische Erkrankungen, deren komplexe Klinik sich in den verschiedensten Symptomen, wie z.B. Neurodermitis, Rhino-Konjunktivitis oder gar Asthma darstellen kann. Ein wichtiger Mechanismus für die Entstehung dieser Krankheit scheint bereits im frühen Kindesalter und sogar pränatal zu existieren.

Um Allergien zu heilen, liegt es daher nahe primär nicht erst im Erwachsenenalter, wenn sich das Krankheitsbild bereits manifestiert hat, zu therapieren, sondern schon im Kindesalter oder sogar pränatal nach Strategien zu suchen, die bereits die Entstehung von Allergien verhindern.

Viele Studien konnten bereits nachweisen, dass u.a. durch Einflussnahme auf die Ernährung eine gezielte Allergieprotektion erzielt werden kann. So konnte u.a. in Finnland gezeigt werden, dass LGG während der Schwangerschaft verabreicht, einen signifikanten Rückgang der Allergien in den Kindern zur Folge hatte. Auch im Tierexperiment konnte eine signifikante Reduktion von allergischen Manifestationen bei den Nachkommen LGG-supplementierter Mütter nachgewiesen werden.

Da in weiteren Studien nachgewiesen werden konnte, dass auch lösliche Produkte des LGG immunmodulatorische Effekte bewirken können, wurde für die vorliegende Arbeit die folgende Hypothese postuliert:

Immunmodulatorische, allergieprotektive Eigenschaften von LGG können durch lösliche Bestandteile des Bakteriums, wie sie in den Überständen der Zellkulturen vorhanden sind, bewirkt werden.

Ausgehend von dieser Hypothese leiten sich die folgenden Fragestellungen für die vorliegende Arbeit ab:

1. Im Mausmodell hat sich eine perinatale, orale Therapie der Mäusemütter mit LGG bereits protektiv auf die Entwicklung bzw. Manifestation von Allergien in den Nachkommen ausgewirkt. Kann diese Beobachtung auch mit dem Überstand von LGG-Zellkulturen als Substituent nachvollzogen werden?
2. Können lösliche, immunologisch aktive Komponenten aus dem Überstand von LGG-Kulturen (LGG_M) isoliert werden?

Zur Beantwortung der Fragestellungen wurde folgendes experimentelles Vorgehen gewählt:

- In-vitro-Analyse zur Wirkung des LGG_M auf Immunzellen
- Überprüfung potentieller immunmodulatorischer, allergieprotektiver Eigenschaften von LGG_M im Tiermodell, analog zu Blümer et al (2007).
- Ansatzweise Charakterisierung aktiver Komponenten aus dem LGG_M

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Es wurden weibliche und männliche BALB/c-Mäuse (Harlan Winkelmann, Borcheln, D) im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Die Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigsystemen gehalten. Die Raumtemperatur betrug bei konstanter Luftfeuchtigkeit 20°C und es wurde ein künstlicher Hell-Dunkel Rhythmus von 12 Stunden erzeugt. Sämtliche Tiere erhielten ovalbuminfreies Wasser und Futter ad libidum.

2.2 Mausmodell der perinatalen Immunmodulation

2.2.1 Maternale Behandlung

Weibliche BALB/c-Mäuse erhielten 200 µl von mit *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) konditionierten Medium (OD 2,2) mittels einer starren, an der Spitze abgerundeten Kanüle als Magensonde an den Tagen 10, 8, 6, 4 und 2 vor der Verpaarung, sowie während der

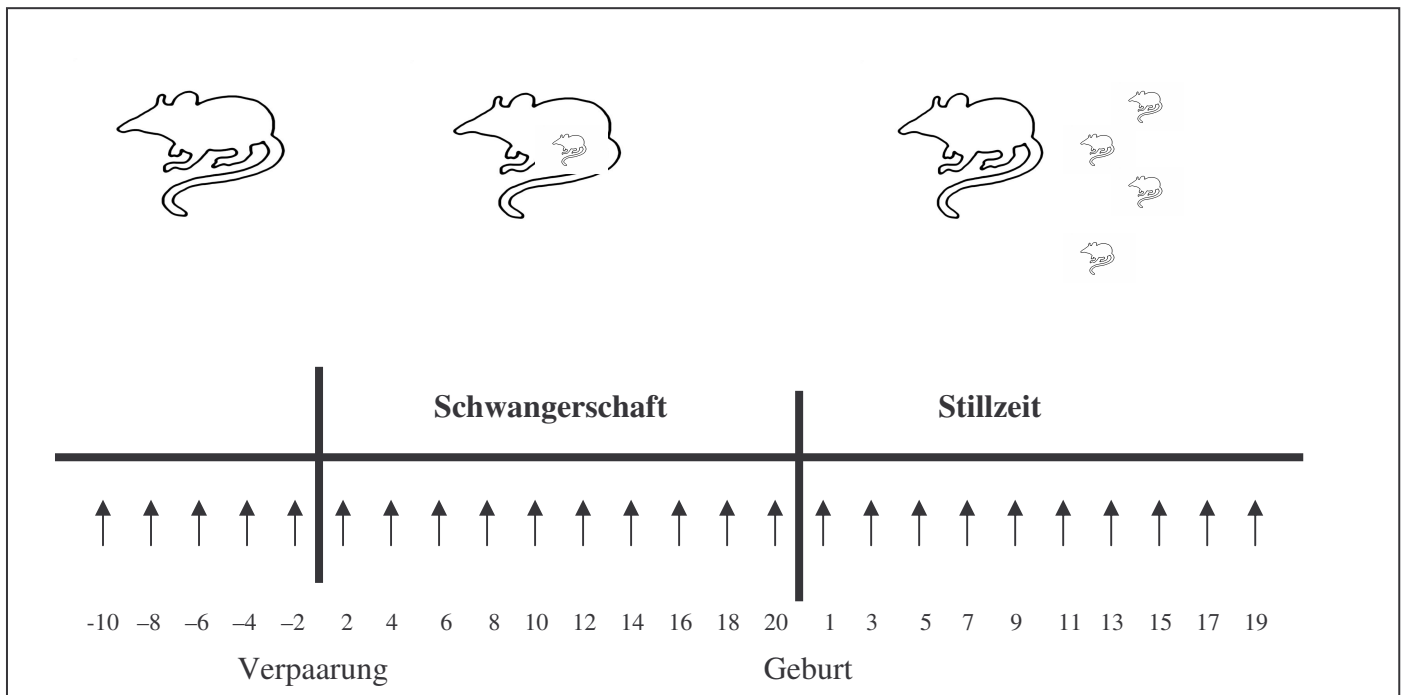


Abb. 8: Protokoll der LGG_M-Applikation der BALB/c Weibchen mit der Dosis von 200µl einer OD 2.2 LGG- Kultur. Die Applikation beginnt 10 Tage vor der Verpaarung und wird alle zwei Tage bis zum 19. Tag nach Beginn des Stillens fortgeführt.

Schwangerschaft und Stillzeit (s. Abb.8). LGG wurde dazu in dem Bakterienmedium MRS Broth angezogen.

Als Kontrollgruppe wurden BALB/c-Weibchen (BALB/c MRS) eingesetzt, die nach gleichem Behandlungsschema mit dem bakteriellen Wachstumsmedium MRS-Broth (DIFCO) behandelt wurden.

2.2.2 Behandlung der Maus-Nachkommen zur Induktion des experimentellen allergischen Asthma bronchiale

Im Maus-Modell wird eine allergische Sensibilisierung durch Immunisierung mit dem artfremden Allergen Ovalbumin (OVA Grade VI, Sigma, Steinheim, D) erzielt. Hierzu werden die Nachkommen an den Tagen 25 und 39 mit 10µg Ovalbumin, gelöst in 15ml PBS sowie 500µl des Adjuvans Aluminiumhydroxid [Al(OH)₃] (Inject Alum, Pierce, USA) intraperitoneal immunisiert (s. Abb.9).

An den Tagen 44, 45, 46 und 47 werden die Tiere in einer luftdichten Expositions-kammer für 20 Minuten einem Ovalbumin-Aerosol (1% Ovalbumin Grade V, gelöst in PBS) ausgesetzt, wodurch es zu einem pulmonalem Antigenkontakt kommt, der die lokale Entzündungsreaktion initiiert.

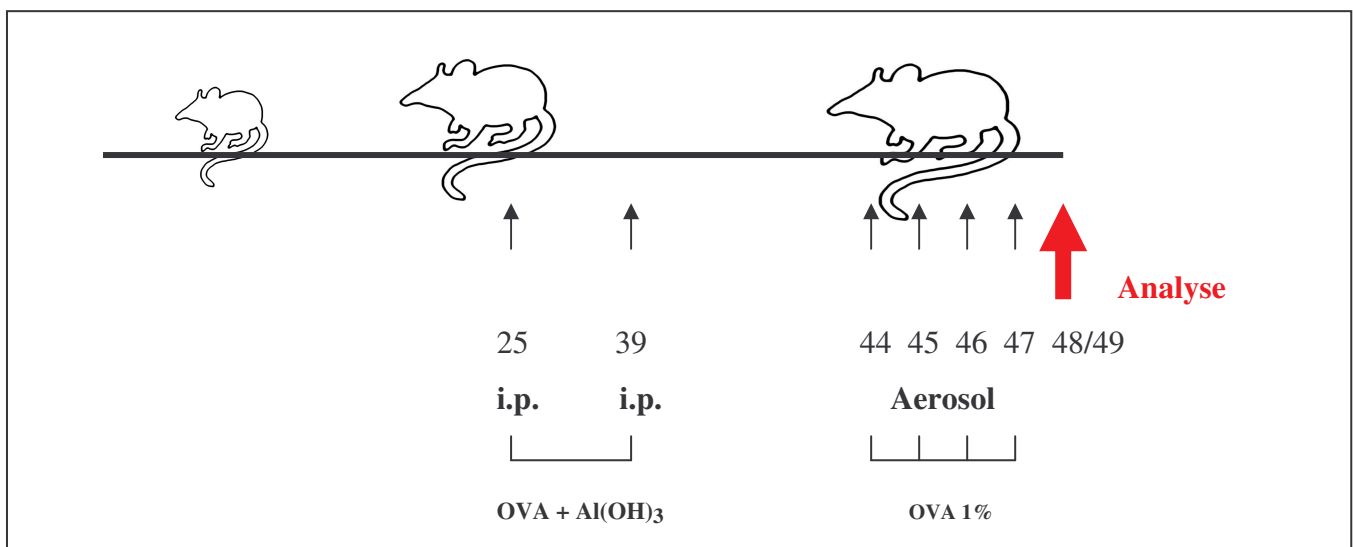


Abb. 9: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung und Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung in den Nachkommen. Am 25. und 39. Tag post partum werden die Nachkommen mit einer i.p. Injektion aus OVA und Aluminiumhydroxid sensibilisiert. Anschliessend erfolgt an den Tagen 44, 45, 46 und 47 die Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung durch ein 1%iges OVA-Aerosol. An den 2 darauffolgenden Tagen findet die Analyse statt.

2.3 Gewinnung von Serumproben

Am Tag 49 erfolgte die Blutentnahme. Um eine Vasodilatation der Schwanzvene zu erreichen, wurden die Tiere vor der eigentlichen Blutentnahme ca. 10 Minuten in einem Wärmeinkubator bei etwa 60°C untergebracht. Durch einen Schnitt in die Schwanzvene wurde dann ca. 300 µl Blut in 1,5 ml fassende Reaktionsgefäße entnommen. Hieran schloss sich eine eineinhalbstündige Inkubationszeit an, in der das Blut bei RT vollständig geronnen. Danach wurden die Proben für 20 Minuten bei 2000g und RT zentrifugiert und schließlich das Serum abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei - 20°C eingefroren.

2.4 Head-out Body-Plethysmographie zum Nachweis einer Atemwegshyperreagibilität

Material

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
β-Methyl-Acetylcholin (Methacholin, MCh)	Sigma, Taufkirchen, D
Latex-Kofferdarm	Roeko, Langenau, D
Glasexpositions-kammer	Forschungswerkstätten, Medizinische Hochschule Hannover, D
Pneumotachographen PTM 378/1.2	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D
Potentiometer CFBA	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D
NOTOCORD hem 3.5 Software	Notocord, Paris, F

Der Head-out-Body-Plethysmograph stellt eine nicht-invasive Methode dar, die Lungenfunktion spontan atmender Mäuse zu messen. Werden die sensibilisierten Tiere während einer Messung einem Bronchokonstriktor wie etwa Metacholin exponiert, so zeigt sich eine Änderung des Atemflusses. Gemessen und letztendlich verglichen wurden die Konzentrationen an Metacholin, die für eine Halbierung des Atemflusses nötig sind (MCH₅₀). Während der Messung befand sich der Rumpf der Maus im Plethysmographen (Abb.10) und der Kopf ragte durch eine luftdichte Halskrause aus Latex-Kofferdarm in die 2,5 Liter große Glasexpositions-kammer hinein. In die von uns verwendete Kammer konnten gleichzeitig vier Plethysmographen eingesetzt werden. Über die Expositions-kammer konnten durch eine Vernebelungsapparatur verschiedene Substanzen, in unserem Fall Methacholin in unterschiedlichen Dosen, appliziert werden. Während der Atmung des Tieres bewegte sich ständig der Brustkorb, so dass Luft bei der Inspiration aus der Plethysmographen-kammer gepresst und bei der Expiration hineingesogen wurde. Der dabei entstandene Luftstrom wurde

von einem Pneumotachographen gemessen. Der Druck in der Kammer entsprach den Fluktuationen am Tachographen und war der Atemstromstärke proportional. Das Signal wurde über ein Potentiometer verstärkt und simultan an ein Oszilloskop und einen Computer zur Datenanalyse weitergeleitet. Die Auswertung erfolgte mit der Software NOTOCORD hem 3.5.

Zu Beginn der Messung wurde die Normalisierung für 15 Minuten gemessen. In diesen 15 Minuten atmete die Maus circa 4000 mal ein und aus ohne das Substanzen in die Expositions-kammer gegeben wurden. Aus den in dieser Zeit ermittelten Werten, des Atemflusses bei Aus- und Einatmung, wurde der Mittelwert errechnet und mit dem Wert 100 gleichgesetzt. Dann folgte die Messung unter Zugabe des Bronchokonstriktors Methacholin (MCh). Das in PBS gelöste MCh wurde alle fünf Minuten für jeweils 70 Sekunden in aerosoler Form in die Expositions-kammer geleitet. Dabei wurden aufsteigende Konzentrationen verwendet: 0 mg/ml MCh, 12,5 mg/ml MCh, 25 mg/ml MCh, 50 mg/ml MCh, 75 mg/ml MCh und schließlich 100 mg/ml MCh.

Unter Provokation mit MCh nimmt die Verengung der Atemwege zu und somit der Atemfluss ab. Die Konzentration, bei der eine Verminderung um 50% erreicht wird gilt als Maß für die Reagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur.

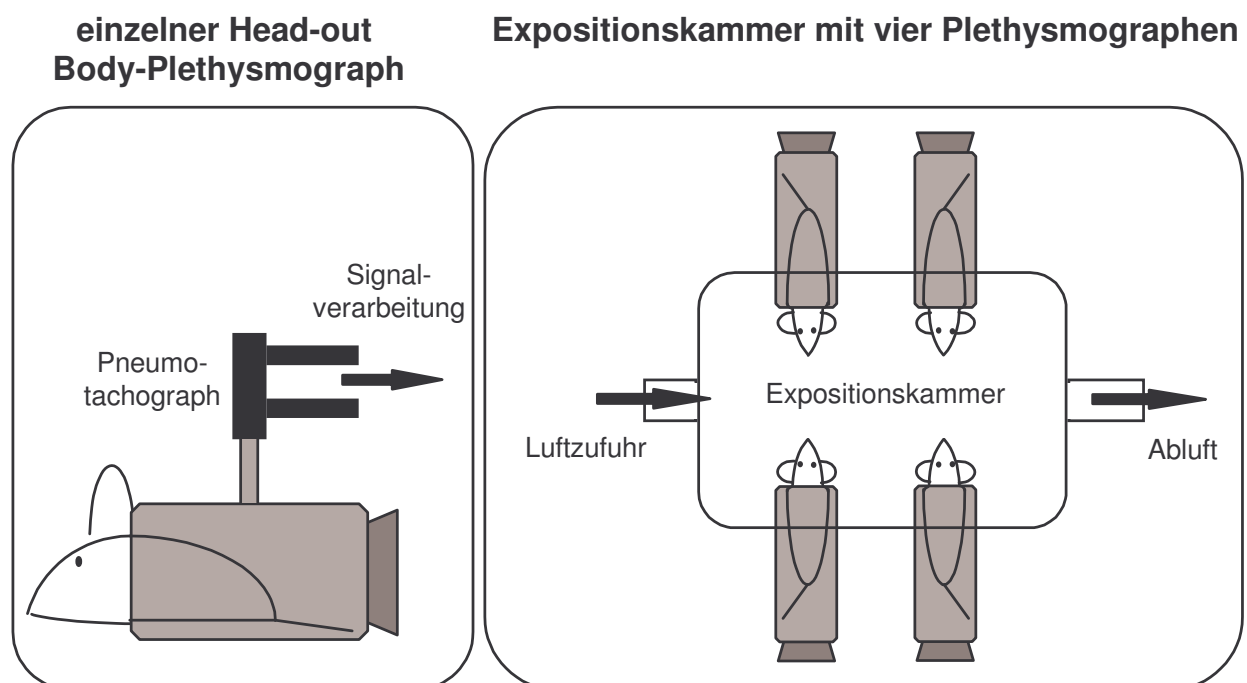


Abb.10: Aufbau des Head-out Body-Plethysmographen (nach Dr. M. Wegmann)

2.5 Präparation der Versuchstiere, Gewinnung und Analyse der BAL

Material

Präparierbesteck

Scheren (HSB 012-11)

Hamacher, Solingen

Pinzetten (Inox 7)

A.Dumont+Fils, Schweiz

Klemmen (13-232-10)

Martin, D

Ethanol 70%

Martin, D

1 mL-Spritzen

Beckton Dickinson, Heidelberg, D

Kanülen (Microlance3 26½G0,45x13)

Beckton Dickinson, Heidelberg, D

PBS-Puffer (Dublecco`s Phosphate Buffered Saline)

PAA Laboratories, Linz, AU

Proteaseinhibitor (complete™ Mini)

Roche, Mannheim, D

1,5 mL Reaktionsgefäße

Eppendorf, Hamburg, D

Durchführung

Durch eine zervikale Dislokation wurden die Tiere getötet und sofort mit 70%igem Ethanol ventral benetzt. Zur Präparation wurden die Tiere dann auf einer Präparationsunterlage fixiert und mit der Schere vom Abdomen her eröffnet. Nach der Eröffnung des Halses wurde durch Beseitigen der Glandula Thyroidea die Trachea freigelegt und mit einer Klemme unter Spannung gehalten und fixiert. Anschließend wurde über die Kanüle 1 ml eiskaltes PBS mit einem Protease-Inhibitor über die Trachea in die Lunge appliziert und direkt wieder entnommen. Im Anschluss wurde die Suspension für 5 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde danach abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei –20°C gelagert.

2.5.1 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Differenzierung der BAL

Material

1 Zytozentrifuge (Cytospin 3)

Shandon, Frankfurt a.M., D

Probenkammer

Shandon, Frankfurt a.M., D

Zytoklip

Shandon, Frankfurt a.M., D

Objektträger (76mm x 26mm)

Matrand, Marienfeld, D

PBS-Puffer (Dublecco`s PhosphateBuffered Saline)

PAA Laboratories, Linz, AU

Pipette

Eppendorf, Hamburg, D

Färbelösungen (Diff-Quick®)
Mikroskop (BH2)

Dade-Behring, Marburg, D
Olympus, Hamburg, D

Bestimmung der Zellzahl:

Zunächst wurden die BAL-Proben 1:2000 mit CASY® ton-Lösung (Schärfe System, Reutlingen, D) verdünnt und dann mittels CASY®TT Zellzählsystem (Schärfe System, Reutlingen, D) die Gesamtzellzahl in der BAL bestimmt.

Differenzierung der Leukozytensubpopulationen:

Zunächst wurden je 50 µl der Proben mit 150 µl PBS verdünnt. Mittels Zytozentrifugation wurden dann die Zellen 5 Minuten bei 320g auf einen Objektträger (76mm x 26mm) zentrifugiert. Anschließend wurden die Präparate 30 Minuten luftgetrocknet und die Zellkerne, sowie das Zytoplasma von Makrophagen, Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten mit einer Diff-Quick®-Lösung gefärbt. Nach einem erneuten Trocknungsvorgang erfolgte dann die Zelldifferenzierung lichtmikroskopisch bei 400facher Vergrößerung anhand morphologischer Kriterien.

2.6 Präparation der Lungen, Anfertigung histologischer Präparate

Material

Formaldehydlösung (4%)	Merck, Darmstadt, D
1ml-Spritzen (BD Plastipak)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
Kanülen (Microlance3 26½G 0,45x13)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
Präparatebehälter (Polyvials 20ml)	Zinsser Analytik, Frankfurt, D
Mikrotom (Accu-Cut® SRM™200 Rotary microtome)	Sakura, NL
Färbelösung (Hämatoxilin II nach Gill)	Merck, Darmstadt, D
Färbelösung (Hämatoxilin III nach Gill)	Merck, Darmstadt, D
Färbelösung (Eosin G)	Merck, Darmstadt, D
Färbelösung (PAS-Färbekit)	Merck, Darmstadt, D
Mikroskop (BH2)	Olympus, Hamburg, D
Ethanol absolut	Riedel-de Häen, Seelze, D

Die Tiere wurden fixiert und eröffnet. Die Trachea wurde kanüliert und die Lungen mit 1ml Formaldehydlösung (4%ig) in situ fixiert. Anschließend wurde die Lunge entfernt und in 4% Formaldehyd gelagert. Nach vollständiger Fixation wurden die Organe in Paraffin eingebettet

und 3 µm starke Dünnschnitte hergestellt. Nun erfolgte die Färbung durch Hämatoxylin-Eosin (HE) sowie Periodic-acid-Schiff (PAS). Die Beurteilung der Proben wird am Mikroskop durch Auszählen eosinophiler Granulozyten in einem repräsentativen Sichtfeld vorgenommen. Hierbei ist darauf zu achten, dass ein Bronchus stets mit seinem Begleitgefäß sichtbar sein muss. Pro Gruppe wurden 12 repräsentative Sichtfelder aus mind. 4 unterschiedlichen Präparaten ausgezählt.

Die HE-Färbung wird verwendet, um Zellen und Gewebe anhand ihrer morphologischen Eigenschaften differenzieren und charakterisieren zu können. Dabei werden mit dem blauen Farbstoff Hämatoxylin saure beziehungsweise basophile Strukturen angefärbt (DNA im Zellkern). Dahingegen werden mit dem roten Farbstoff Eosin basische, beziehungsweise acidophile oder auch eosinophile Strukturen (Proteine im Zytoplasma) angefärbt.

Um die auf Objektträgern aufgezogenen Schnitte färben zu können, mussten diese entparaffiniert und entwässert werden. Zum Entparaffinieren wurden sie für 20 Minuten in einen Xylolersatz eingetaucht. Danach wurden sie zum Rehydrieren durch eine absteigende Alkoholreihe, bestehend aus 100% Ethanol (2 mal), 90% Ethanol, 80% Ethanol und 70% Ethanol geführt. Dabei wurden die Schnitte für jeweils 2 Minuten in der jeweiligen Ethanollösung belassen. Nach Spülen mit Wasser wurden die Schnitte für 8 Minuten in Hämatoxylin gegeben und anschließend für 10 Minuten unter fließendem, warmem Leitungswasser gebläut. Hierbei wird durch das Leitungswasser der pH-Wert erhöht, was zur Ausbildung der typischen violett-blauen Färbung führt. Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten in Eosin (1%, wässrige Lösung) inkubiert. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Präparate zum Entwässern durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol, 80% Ethanol, 90% Ethanol und 2 mal 100% Ethanol) und Xylolersatz geführt, aber, um ein Entfärben zu vermeiden, nur kurz in den ersten beiden Lösungen belassen. Anschließend wurden die Schnitte mit VectaMount eingedeckt.

Bei der PAS-Färbung werden 1,2-Glykole in unsubstituierten Polysacchariden, Muko- und Glykoproteinen, sowie neutrale Mukopolysacchariden durch die Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert. In Verbindung mit der Schiff-Reaktion erhalten die Präparate dann eine rote Farbe, wobei durch diese spezifische Anfärbung die Mukusbestandteile sichtbar und somit eine evtl. erhöhte Mukusproduktion nachweisbar wird. Die Anzahl der mukusproduzierenden Zellen wird anhand eines histologischen Scores (- wenig; ±mittel; + viel) ausgewertet.

Analog der HE-Färbung erfolgte das Entparaffinieren sowie die Rehydratation. Zur Färbung wurden die Schnitte nach dem Spülen mit Wasser für 15 Minuten im Schiffs Reagenz inkubiert. Hieran schloß sich ein 15-minütiges Spülen mit Leitungswasser an. Danach wurden die Schnitte in Hämatoxylin II Lösung nach Gill für eine Minute inkubiert und anschließend wieder gut gespült. Analog der HE-Färbung folgten nun die Entwässerung, sowie das Eindecken.

2.7 Ex-vivo stimulierte Zytokinproduktion der Milzzellen

Material

Falcon Zellsieb 100µm	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zentrifuge Rotina 48RS	Hettich, Tuttlingen, D
Casy® Cell Counter Model TT	Schärfe System, Reutlingen, D
Mikroskop BH2	Olympus, Hamburg, D
Lympholyte® Trennmedium	Cedarlane, Hornby, CAN
RPMI 1640 Kulturmedium	PAA Laboratories, Linz, AU
+ Glutamin (2mM)	PAA Laboratories, Linz, AU
+ Streptomycin (100mg/ml)	Seromed, Berlin, D
+ Penicillin (100U/ml)	Seromed, Berlin, D
+ Amphotericin B (Fungizone®)(1,25mg/ml)	Gibco BRL, Eggenstein, D
+ Fetales Kälberserum (10%)	Seromed, Berlin, D

2.7.1 Herstellung einer Milzzellsuspension

Unter semi-sterilen Bedingungen wurde dem getötetem Tier die Milz entnommen und dann zunächst in sterilem RPMI-Medium aufbewahrt.

Im Anschluss wurden die Zellen durch vorsichtiges Drücken durch ein feinmaschiges Nylonnetz (Porengröße: 100 µm) aus dem Gewebe gelöst. Die nun gewonnene Einzellsuspension wurde in 4 ml RPMI-Medium aufgenommen.

2.7.2 Separation der mononucleären Milzzellen durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Um die Leukozyten aus der Milzzellsuspension zu separieren, wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Hierzu wurde ein Volumen Trennmedium mit dem

entsprechendem Volumen Zellsuspension überschichtet. Im Anschluss wurde die Probe 20 Minuten bei 1200 g und 4°C ungebremst zentrifugiert. Hierbei schieden sich die mononucleären Milzzellen gemäß ihrem Dichteunterschied zu anderen Strukturzellen, sowie Erythrozyten und Granulozyten an der Phasengrenze ab. Dieser Interphasenring wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS vom Separationsmedium befreit. Im Anschluss wurde dann die Leukozytenkonzentration mittels Casy® Zellzählsystem bestimmt.

2.7.3 Ex-vivo-Stimulation der mononucleären Milzzellen

Material

RPMI 1640 Kulturmedium
24-well Gewebekulturplatte
Brutschrank

PAA Laboratories, Linz, AU
Greiner, Frickenhausen, D
Heraeus, Berlin, D

Die Milzzellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml auf eine Zellkulturplatte mit 24 Kavitäten in einem Volumen von je 1ml in RPMI 1640 Medium ausgesät. Die Restimulation zur Zytokinproduktion erfolgte durch Zugabe von OVA (50µg/ml). Als Negativkontrolle erfolgte die Zellkultivierung ohne OVA-Zugabe. Die Zellkulturen wurden dann für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen resuspendiert, 5 Minuten bei 800g und RT zentrifugiert und der so gewonnene Überstand in 1,3 ml fassende Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur weiteren Analyse bei – 80°C eingefroren.

2.8 Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die Serum-konzentrationen der OVA-spezifischen Immunglobuline der Klassen IgE, IgG₁ und IgG_{2a}, die Zytokinkonzentrationen von IFNγ und IL-10 der ex-vivo stimulierten mononucleären Milzzellen und die Konzentrationen von IL-5 in der BAL werden mittels Sandwich-ELISA bestimmt.

2.8.1 Zytokinbestimmung in den Milzzellüberständen und der BAL mittels ELISA

Material

96-Well Mikrotiterplatten	NUNC, DK
Mehrkanalpipette (Finnpipette®)	Labsystems, Helsinki, FIN
Schüttler (IKA- Schüttler MTS4)	IKA-Werke, Staufen, D
Mehrkanalwasher (Nunc-Immuno Wash 12)	NUNC, DK
Photometer (Tecan-Photometer Sunrise)	Tecan, Salzburg, AU
Photometersoftware (Magellan 3)	Tecan, Salzburg, AU
Streptavidinperoxidase (1 mg/ml)	Sigma, Steinheim, D

Waschpuffer:

PBS mit 0,1 % Tween (9,55 g PBS auf 1 l Mili-Pore-Wasser + 1 ml Tween)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

Biochrom AG, Berlin, D

Tween 20

Roth, Karlsruhe, D

Coating-Puffer:

4,2 g NaHCO₃ auf 500 ml H₂O, pH 8,3

NaHCO₃ Natriumhydrogencarbonat

Merck, D

Blockpuffer:

PBS + 1 % BSA (10 g BSA auf 1 l PBS)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

Biochrom AG, Berlin, D

BSA Albumin bovine Fraction V

Serva, D

Substratlösung:

BM blue, POD Substrat

Roche, Mannheim, D

Stopplösung:

2M H₂SO₄ Lsg. (96%ige Schwefelsäure in 889ml dest. H₂O verdünnen)

H₂SO₄ Schwefelsäure 95-97%

Merck, D

Zytokine:

Primäre Antikörper:

Anti-mouse IL-4, 0,5 mg/ml

BD Pharmingen, D

Anti-mouse IL-5, 0,5 mg/ml

BD Pharmingen, D

Anti-mouse IFN- γ , 0,5 mg/ml

BD Pharmingen, D

Höchster Standard:

Recombinant Mouse IL-4: 4000 pg/ml

BD Pharmingen, D

Recombinant Mouse IL-5: 4000pg/ml

BD Pharmingen, D

Recombinant Mouse IFN- γ : 10000pg/ml

BD Pharmingen, D

Sekundäre Antikörper:

Biotinylated anti-mouse IL-4, 0,5 mg/ml	BD Pharmingen, D
Biotinylated anti-mouse IL-5, 0,5 mg/ml	BD Pharmingen, D
Biotinylated anti-mouse IFN- γ , 0,5 mg/ml	BD Pharmingen, D

BD OptEIA-Kit:	BD, Heidelberg, D
----------------	-------------------

Primärer Antikörper:

Anti-mouse IL-6, IL-10, IL-13 und TNF- α (0,5 mg/ml)	BD, Heidelberg, D
---	-------------------

Höchster Standard:

IL-13: 500 pg / ml	BD, Heidelberg, D
TNF- α , IL-6: 1000 pg / ml	BD, Heidelberg, D
IL-10: 2000 pg / ml	BD, Heidelberg, D

Sekundärer Antikörper:

Biotinylated Anti-mouse IL-6, IL-10, IL-13 und TNF- α (0,5mg/ml)	BD, Heidelberg, D
---	-------------------

Immunglobuline:

OVA-spezifisches IgE

OVA Grad VI (A-2512) in PBS	Sigma, Steinheim, D
Standard: Anti-Ova-IgE Antikörper (MCA 2259) (Höchster. Standard: 200ng/ml)	PharMingen, San Diego, USA
Sek. Antikörper: Anti-mouse IgE (553419)	PharMingen, San Diego, USA

OVA-spezifisches IgG1

OVA Grad VI (A-2512) in NaHCO ₃	Sigma, Steinheim, D
Standard: Anti-Ova IgG1 Endkonz.: (A-6075) (Höchster Standard: 50ng/ml)	Sigma, Steinheim, D
Sek. Antikörper: Anti-mouse IgG1 biotin. (553441)	PharMingen, San Diego, USA

OVA-spezifisches IgG2_a

OVA Grad VI (A-2512) in PBS	Sigma, Steinheim, D
Standard: Antiovalbumin chicken (HYB 094-07-02) (Höchster Standard: 10ng/ml)	Dianova
Sek. Antikörper: Antimouse IgG2 _a biotin. (553388)	PharMingen, San Diego, USA

Die primären Antikörper wurden zunächst verdünnt (IFN γ in PBS [3 μ g/ml], IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und TNF- α in Natriumhydrogencarbonat-Lösung [1 μ g/ml]) und dann jeweils 50 μ l pro Kavität auf eine 96 Kavitäten fassende Flachboden-Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach Inkubation der Kavität bei 4°C über Nacht wurde sie dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Um die nicht durch Antikörper belegten Bindungsstellen zu blocken, wurden pro

Kavität 150 µl Blockpuffer zugegeben und die Platte dann bei RT für 2-4 Stunden auf dem Schüttler inkubiert.

Nach erneutem Waschgang wurden nun die Standardreihen in einer Verdünnungsreihe von 10 Schritten bei einer Verdünnung von je 1:2 sowie die Proben unverdünnt (in Doppelbestimmung bei 50 µl / Kavität) aufgetragen und bei 4°C über Nacht gelagert.

Überschüssige, nichtgebundene Antigene wurden anschließend durch dreimaliges Waschen aus den Kavitäten entfernt. Die durch den primären Antikörper gebundenen Antigene wurden nun durch den sekundären, biotinylierten Antikörper detektiert.

Hierzu gibt man die entsprechend in Waschpuffer verdünnten sekundären Antikörper (Endkonzentrationen: IFN γ , TNF- α , IL-4: 1 µg/ml; IL-5, IL-6, IL-10: 2 µg/ml, IL-13: 0,1µg/ml) in das jeweilige Kavität und inkubiert bei RT (2h) auf dem Schüttler.

Nach wiederum dreimaligem Waschen wurden pro Kavität 50 µl des Streptavidin-Peroxidase-Enzymkomplexes (Endkonzentration: 1 µg/ml) gegeben und die Platte dann bei RT im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert.

Im Anschluß wurde sechsmalig gewaschen und schließlich je 100 µl des Substrats BM blue zugegeben, wobei die durch das Streptavidin konjugierte Base mit dem Farbstoff reagiert (Blaufärbung). Nach 3-10 Minuten wurde die Reaktion mit jeweils 50 µl Schwefelsäure (2 M) gestoppt und es erfolgt durch die Protonierung des TMB ein Farbumschlag ins Gelbe.

Durch die photometrische Messung (Testfilter 450nm) wird nun mit Hilfe der Standardkurve die Konzentration der zu bestimmenden Substanz über die Software Magellan errechnet.

2.8.2 Konzentrationsbestimmung von Serumimmunglobulinen

Zur Herstellung des Mausserums siehe 2.3, S. 27. Zur Bestimmung der Immunglobulinkonzentration im Mausserum wurde zunächst eine Flachboden-Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) mit je 50 µl einer OVA-Lösung (20 mg/ml mit 1:1000 in Beschichtungspuffer verdünnt) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Platte wurde nach dem Verwerfen der Lösung dreimalig mit Waschpuffer gewaschen und die noch übrigen Bindungsstellen mit 100 µl Blockpuffer für 3 Stunden bei RT geblockt.

Anschließend wurden die Proben entsprechend der zu messenden OVA-spezifischen Ig-Subklassen verdünnt (IgE: 1:20; IgG₁: 1:1000; IgG₂: 1:500.000). Die so hergestellten Proben

sowie die Ig-Standards wurden nach erneutem dreimaligem Waschen aufgetragen. Nun erfolgte wiederum eine Inkubation bei 4°C über Nacht.

Nach dreimaligem Waschen wurde jeweils 50 µl des entsprechenden biotinylierten Antikörpers der Klasse Anti-Maus IgE, Anti-Maus IgG₁ sowie Anti-Maus IgG₂ in einer Konzentration von 2,5µg/ml hinzugegeben und für 2 Stunden auf dem Schüttler bei RT inkubiert.

Die weiteren Schritte erfolgten analog.

2.9 Zelllinien und Kultivierung von Zellen

2.9.1 Makrophagenzelllinie

Für die in-vitro Studien wurde die murine Makrophagenzelllinie RAW 264.7 (dankenswerterweise von Herrn Prof. Lohoff, Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene an der Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt) genutzt, welche aus einem AMLV (Abelson murine leukemia virus) induzierten Tumor aus Balb/c-Mäusen isoliert wurden.

2.9.2 Kultivierung der Makrophagenzelllinie

Material

FCS Gold	PAA Laboratories, Cölbe, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe, D
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe, D
Dulbecco`s MEM (1x) high Glucose, L-Glutamine	Biochrom AG, Berlin, D
PBS (Dublecco`s, pH 7)	PAA Laboratories, Linz, AU
15 ml Falcons	Sarstedt, Nürnbrecht, D
75 cm ² Zellkulturflaschen	NUNC, Roskilde, DK
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nürnbrecht, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D
24-Well Platten	NUNC, Roskilde, DK

Für die Kultivierung der RAW-Zellen wurde DMEM mit hohem Glukosegehalt und stabilem L-Glutamin sowie 10% hitzeinaktiviertem FCS (fetales Kälberserum) und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet.

Für die Subkultivierung wurde das verbrauchte Medium einer 75cm² Zellkulturflasche vollständig abgenommen und diese mit 10 ml eiskaltem, sterilem PBS zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden aufgefüllt. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen vorsichtig mit einem weichen Zellschaber abgeschabt und in ein 15 ml fassendes Probengefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 200 g wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das auf dem Boden des Probengefäßes befindliche Zellpellet wurde in 9 ml frischem Medium resuspendiert und dann jeweils 3 ml mit auf neue Zellkulturflaschen überführt (1:3 Verdünnung). Schließlich wurde mit frischem Zellkulturmedium auf 20 ml aufgefüllt und die Zellkulturflaschen dann im Wärmeschrank inkubiert (37°C, 5%CO₂).

Diese Subkultivierung wurde zweimal pro Woche durchgeführt.

2.9.3 Stimulation der RAW-Makrophagenzelllinie mit LGG_M

Die Makrophagen wurden mit einer Konzentration von 1x10⁶ Zellen/ml in einer 24 Kavitäten umfassenden Platte (1 ml/Kavität) ausgesät. Die quantitative Bestimmung der Zellen erfolgte hierbei mit einem Cell-Counter (Casy®). Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen stimuliert:

Hierzu wurden die Zellen mit 0,9 ml frischem Zellkulturmedium sowie 100 µl konditioniertem Medium (OD der Kultur 2,2) für 24 Stunden inkubiert.

2.9.3.1 DNase Behandlung von LGG_M

Material

DNase Kit „Turbo DNA-free™“

Ambion Ltd., USA

Turbo DNase (2 Units/7µl)

Turbo DNase Puffer

DNase Inaktivierungsreagenz

Nukleasefreies Wasser

0,5 ml Reaktionsgefäß

Eppendorf, Hamburg, D

Zentrifuge Megafuge 1.0R

Heraeus, Osterode, D

TBE-Gel (1,5%):

Tris-Borate-EDTA (1,5 g /100 ml) peqlab, D

Agarose-Gel (1,5%):

Agarose LM-MP (1,5 g / 100 ml) Roche, D

Ethidiumbromidlösung (5 µl) Roth, D

Um einen Abbau der DNA im LGG-konditioniertem Medium zu erzielen, wurden 80 µl des LGG_M mit 10 µl DNase-Puffer und 1 µl DNase zusammengeführt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 µl des Inaktivierungsreagenz aus dem DNase-Kit gestoppt. Nach zwei Minuten Inkubation unter ständigem Schütteln wurde die Probe bei 10.000 rpm zentrifugiert, wobei sich die für die Reaktion verwandten Reagenzien und evtl. abgebaute DNA als Pellet absetzten und der nun DNA-freie Überstand abgenommen werden konnte.

Zum Nachweis der suffizienten Aktivität der DNase wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 10 µl der denaturierten Proben/Marker auf das Agarose-Gel aufgetragen und die Elektrophorese mit einer Laufzeit von 1h bei 100 V durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels UV-Licht an einer Gel Dokumentationsstation.

2.9.3.2 Behandlung des LGG_M mit Proteinase K

Material

Proteinase K	Sigma, Missouri, USA
Protease Inhibitor „Complete mini“	Roche, Mannheim, D
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford Illinois, USA
Natronlauge (5M)	Merck, Darmstadt, D
pH-Meter accumet® model 15	D.I.C., USA

Probenpuffer:

10 ml 1,5 M Tris (pH= 6,8) + 6 ml 20 % SDS + 30 ml Glycerin +
15 ml β- Mercaptoethanol + 1,8 g Bromphenolblau mit A. dest auf
100 ml auffüllen, aliquotieren und bei – 20 °C lagern

SDS	Roth, Karlsruhe D
TRIZMA-Base	Sigma, Taufkirchen, D
Glycerin	Sigma, Taufkirchen, D
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, D
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen, D

Trenngelpuffer pH 8,8

1 g SDS+ 45,43 g Tris Base+ 200 ml A. dest mit HCl auf
pH=8,8 einstellen und mit A. dest auf 250 ml auffüllen

SDS	Roth, Karlsruhe D
TRIZMA-Base	Sigma, Taufkirchen, D
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, D

Sammelgelpuffer pH 6,8

1,5 g SDS+ 9 g Tris Base+ 200 ml A. dest mit HCl auf pH=6,8
einstellen und mit A. dest auf 250 ml auffüllen

SDS	Roth, Karlsruhe D
TRIZMA-Base	Sigma, Taufkirchen, D
HCl	Merck, Darmstadt, D

Laufpuffer

20g SDS+ 288 g Glycin+ 50g Tris Base mit A. dest. auf 2 Liter auffüllen

SDS	Roth, Karlsruhe D
Glycin	Sigma, Taufkirchen, D
TRIZMA-Base	Sigma, Taufkirchen, D

Ammonium Persulfat (APS)	Bio Rad, München, D
N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, D
Polyacrylamid 30% (Gel30)	Roth, Karlsruhe, D
MagicMark-Protein-Marker	Invitrogen, Karlsruhe, D
Bench-Protein-Marker	Invitrogen, Karlsruhe, D
Elektrophorese-System	Bio Rad, München, D
Spannungsgenerator 2301 Macrodrive 1	LKB, Broma, S
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D

Tabelle 2: SDS-Gel (10%)

SDS-Gel (10%)		
	Trenngel	Sammelgel
Gel30	3,3 ml	720 µl
Trenngelpuffer	2,5 ml	
Sammelgelpuffer		1,2 ml
H ₂ O	4,2 ml	2,8 ml
APS	50 µl	10 µl
TEMED	10 µl	12 µl

Zur Entfernung der Proteine des LGG_M wurde dieser mit Proteinase behandelt.

Da der physiologische pH-Wert des LGG-konditionierten Mediums bei 3,9-4,2 lag, wurde mit 5 M Natronlauge auf Werte um pH 8 zu titriert, um den optimalen pH-Bereich für die Aktivität der Proteinase zu erreichen. Im Anschluß wurde in ein 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß 1 ml konditioniertes Medium und 5 µl der Proteinase pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 Stunden bei 37 °C wurde die Probe entnommen. Um die nach der Inkubationszeit noch aktive Proteinase zu inaktivieren, wurden die Proben mit einem Protease-Inhibitor versehen.

Im Anschluss wurden die Proteine der Proben mit Hilfe der **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)** nachgewiesen. Zur Durchführung wurden je 25 µl der Proben mit je 6 µl SDS-Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und anschließend anzentrifugiert. Die denaturierten Proteine wurden dann auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen und es erfolgte die Elektrophorese für 1 Stunde bei 112 V.

2.9.4 Nachweis von IL-10, IL-6 und TNF- α auf mRNA-Ebene

2.9.4.1 RNA-Isolierung aus RAW-Zellen

Material

RNeasy® Mini Kit

β-Mercaptoethanol

Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco

Qiagen, Hilden, D

Sigma, Taufkirchen, D

Kendro, Langenselbold, D

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits von Qiagen. Die Technik der RNA-Isolierung mit der RNeasy® Mini Säule kombiniert das selektive Binden von RNA an eine Silica-Gel-Membran mit der Geschwindigkeit der Mikrosprinttechnologie. Ein spezialisiertes Puffersystem mit hohem Salzgehalt ermöglicht die Bindung von bis zu 100 µg RNA an die Membran. Die Zellen werden in Anwesenheit eines hoch denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat enthaltenden Puffers (RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol) lysiert und homogenisiert, der sofort die RNAsen inaktiviert und so für die Isolierung von intakter RNA sorgt.

Die RAW-Zellen wurden nach der Stimulation zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 350 µl RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol lysiert und 350 µl Ethanol (70%) zugegeben. Das entstandene Gemisch wurde auf eine RNeasy[®] Mini Säule gegeben und diese zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit 700 µl RW1- und zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen, wodurch Zellreste und Kontaminationen entfernt wurden. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wurden die letzten Pufferreste entfernt. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 µl RNase-freiem-Wasser.

2.9.4.2 Verdau der DNA

Material:

Desoxyribonuclease I, Amplifikation Grade
HLC Block Thermostat

Invitrogen, Karlsruhe, D
HLC Biotech, Bovenden, D

Zur Entfernung von kontaminierender DNA aus der RNA-Präparation wurde ein Verdau mit DNase I durchgeführt. Hierzu wurde der Desoxyribonuclease I Amplifikation Grade Kit von Invitrogen verwendet. Die komplette RNA-Präparation (22 µl) wurde mit 1,4 µl DNase I und 2 µl 10x Reaktionspuffer versetzt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA und eine zehnminütige Inkubation bei 65°C wurde die enzymatische Aktivität der DNase inaktiviert. Die nun DNA-freie RNA konnte bei -80°C gelagert werden.

2.9.4.3 Reverse Transkription

Material:

Omniscript[®] Reverse Transcription Kit
Oligo-dT 18 Primer
Biometra TRIO-Thermoblock

Qiagen, Hilden, D
MWG-Biotech, Ebersberg, D
Biometra, Göttingen, D

Bei der Reversen Transkription dient die aufgereinigte RNA als Matrize für die Synthese von cDNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase. Hierzu wurden 0,5 µg der RNA mit 2 µl 10x RT-Puffer, 2 µl dNTP-Mix (Endkonzentration: 0,5 mM je dNTP), 1 µl Oligo-dT

18 Primer (Endkonzentration 1 μM) und 1 μl der Omniscript Reversen Transkriptase versetzt und der Ansatz mit RNase-freiem-Wasser auf 20 μl aufgefüllt. Danach erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C und 5 Minuten bei 93°C. Die auf diese Weise erhaltene cDNA wurde 1:2 mit RNase-freiem-Wasser verdünnt und konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

2.9.4.4 Quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Material

QuantiTect TM SYBR [®] Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, D
Primer	MWG Biotech, Ebersberg, D
Light-Cycler [®] LC II	Roche, Mannheim, D
Light-Cycler [®] Capillaries (20 μl)	Roche, Mannheim, D

Die bei diesem Versuch verwendete Methode ist eine real-time quantitative PCR, die mit einem Gerät durchgeführt wird, das aus einer Kombination aus PCR-Gerät und Fluoreszenzdetektion besteht. Die PCR wurde mit dem QuantiTectTMSYBR[®] Green-Kit durchgeführt, welcher eine Taq-Polymerase, einen dNTP Mix, PCR-Puffer und den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I enthält. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und ist dann fluoreszierend. Je mehr PCR-Produkt erzeugt wird, desto stärker ist die Fluoreszenzintensität der Probe. Da der Light-Cycler nach jeder Elongationsphase die Fluoreszenzintensität misst, kann somit stets eine Zunahme des PCR-Produkts verfolgt werden.

Der PCR-Ansatz wurde folgendermaßen hergestellt:

10 μl QuantiTectTMSYBR[®] Green PCR Master Mix, 0,4 μl sense primer (50 pmol / μl), 0,4 μl antisense primer (50 pmol/ μl), 1 μl cDNA aus der Reversen Transkription und 8,2 μl Wasser wurden gemischt und in eine Light-Cycler-Kapillare pipettiert. Die Kapillare wurden danach kurz anzentrifugiert und dann in das Gerät gestellt.

Der erste Schritt im Programm des Light-Cycler besteht in einem 15-minütigem Aktivierungsschritt der Taq-Polymerase bei 95°C. Darauf folgten 55 Zyklen Denaturierung (15 Sek./ 94°C), *Annealing* (30 Sek./ 60°C) und Extension (15 Sek./ 72°C).

Tabelle 3: Primerdaten für die PCR

Gen	Sense-Primer	Antisense-Primer	Annealing-temperatur	Produkt-größe
IL 10	GCA TGG CCC AGA AAT CAA GG	TCT TCA CCT GCT CCA CTG CC	60°C	131 bp
IL 6	TGC CTT CTT GGG ACT GAT GC	GCC TCC GAC TTG TGA AGT GG	60°C	124 bp
TNF α L32	AGC CCA CGT CGT AGC AAA CC	TAC AAC CCA TCG GCT GGC AC	60°C	129 bp
	AAG CGA AAC TGG CGG AAA CC	CTG GCG TTG GGA TTG GTG AC	62°C	290 bp
GAPDH	CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA	CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT	62°C	300 bp

Um quantitative Unterschiede in der Expression von IL-10, IL-6 und TNF- α feststellen zu können, wurde zuerst eine PCR mit dem Haushaltsgen GAPDH durchgeführt. Auf der Grundlage der Ergebnisse aus dieser PCR wurden durch Verdünnen der cDNA alle Proben auf die Probe mit der niedrigsten Konzentration abgeglichen. Zur Kontrolle des Abgleichs wurde eine quantitative PCR mit dem Haushaltsgen L32 durchgeführt, die nun für alle Proben eine sehr einheitliche Expression aufzeigt ($\pm 0,5$ Zyklen). Danach wurde die PCR mit den Primern für das zu analysierende Gen, z.B. IL-6, durchgeführt. In allen PCRs wurde ein selbst hergestellter Standard mitgeführt, an Hand dessen die quantitativen Bestimmungen erfolgten. Die Konzentration des höchsten Standards wurde mit 1000 angegeben. Die in der Arbeit angegebene Konzentration der Proben beziehen sich auf den jeweils spezifischen Standard und stellen daher relative Angaben dar.

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische und graphische Auswertung, sowie die Berechnung der Signifikanz wurden mit Hilfe dem Programm GraphPad Prism[®] (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM (standard error of mean, Standardfehler des Mittelwerts) angegeben. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein (ungepaarter) t-Test durchgeführt. Dabei gilt: $P < 0,001$ extrem signifikant (***), $P 0,001-0,01$ sehr signifikant (**), $P 0,01-0,05$ signifikant (*) und $P > 0,05$ nicht signifikant (ns).

3. Ergebnisse

3.1 In vivo-Studien

Im Mausmodell wurde bereits gezeigt, dass eine perinatale Supplementation von Mutter-Mäusen mit Lactobacillus GG die Allergieentwicklung deren Nachkommen supprimiert.

Auch wurde gezeigt, dass sezernierte LGG-Komponenten in vitro die Funktion von Immunzellen beeinflussen können.

In dieser Studie sollte die Frage beantwortet werden, ob mit immunologisch aktiven LGG-Komponenten angereichertes LGG-konditioniertes Medium (LGG_M) ebenfalls in der Lage ist, die Allergieentwicklung in den Nachkommen zu unterdrücken.

BALB/c-Weibchen wurde hierzu vor der Verpaarung, während der Schwangerschaft und während der Stillzeit 200 µl LGG-konditioniertes Medium intragastrisch alle zwei Tage verabreicht. Als Kontrollgruppe wurden BALB/c-Mäuse eingesetzt, denen nach dem gleichen Behandlungsprotokoll statt LGG_M nicht konditioniertes, reines Medium verabreicht wurde.

Basierend auf einem Standardmodell zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung wurden die Nachkommen an den Tagen 25 und 39 mit OVA i.p. sensibilisiert. An den Tagen 44, 45, 46 und 47 wurden die Tiere zur Induktion der allergischen Entzündung in den Atemwegen einem OVA-Aerosol ausgesetzt. An den Tagen 48 und 49 erfolgten verschiedene Analysen zur Charakterisierung des immunologischen, histologischen und physiologischen Phänotyps, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind.

3.1.1 OVA-spezifische Antikörper

Um die Auswirkungen einer maternalen Supplementation mit LGG_M auf die allergische Sensibilisierung in den Nachkommen zu untersuchen, wurden in den Nachkommen die Titer OVA-spezifischer Antikörper detektiert.

Mittels ELISA-Technik wurden die OVA-spezifischen Immunglobulintiter für IgE, IgG₁ und IgG_{2a} bestimmt. Die Ergebnisse zeigen zwar deutlich den erwarteten Anstieg der OVA-spezifischen Immunglobulintiter aller Klassen nach Sensibilisierung, jedoch keinen

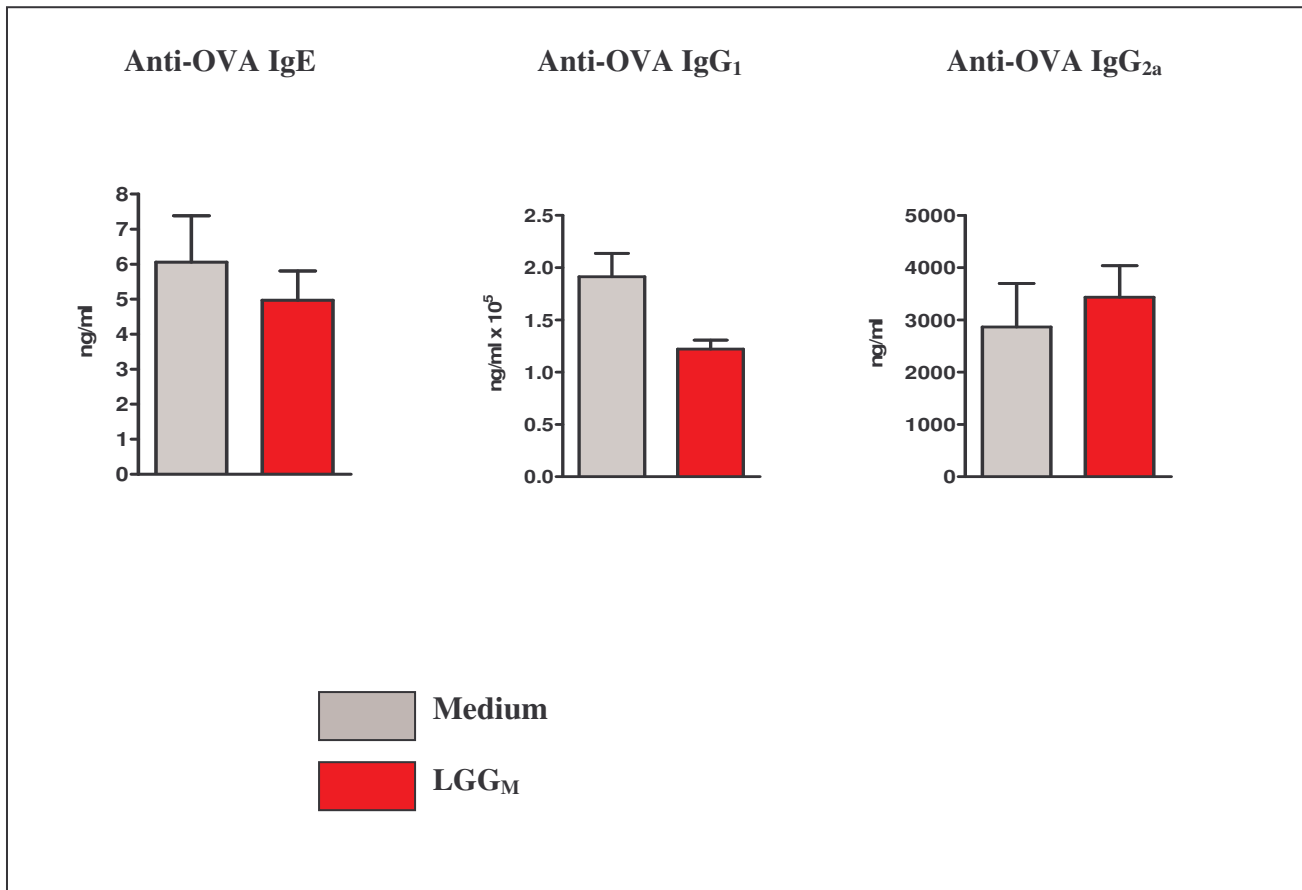


Abb. 11: OVA-spezifische Immunglobulintiter im Serum der Nachkommen von mit LGG_M behandelten (rot) und mit Kontroll-Medium behandelten Muttertieren (grau). Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Anstieg aller Immunglobulinklassen, jedoch keine signifikanten Unterschied zwischen den Nachkommen der mit LGG_M behandelten Muttertiere und den Nachkommen der Kontrollgruppe.

signifikanten Unterschied zwischen den Nachkommen der mit LGG_M behandelten Muttertiere und den Nachkommen der Kontrollgruppe (siehe Abb.11). Es war keine Suppression der OVA-spezifischen Immunglobuline in den Nachkommen durch eine maternale LGG_M-Supplementation nachzuweisen.

3.1.2 Analyse der BAL

Die Atemwegsentzündung ist ein Charakteristikum in der Pathophysiologie des allergischen Asthma. Sie ist charakterisiert durch ein Infiltrat von eosinophilen Granulozyten, die durch Freisetzung von Mediatoren (Zytokine) sowie zelltoxischen Substanzen besonders an der

Aufrechterhaltung der Entzündung, an Umbauprozessen und weiterer Förderung der Hyperreagibilität beteiligt sind. Durch die Methode der BAL werden Zellen und Proteine, die in das broncho-alveoläre Lumen infiltriert sind, bzw. sich in diesem Kompartiment befinden, herausgewaschen und können anschliessend quantitativ bestimmt werden.

3.1.2.1 Leukozyten in der BAL

Am Analysetag wurde zunächst eine BAL bei den Nachkommen von mit LGG_M bzw. Kontrollmedium behandelten Müttern vorgenommen und die Anzahl der Leukozyten bestimmt.

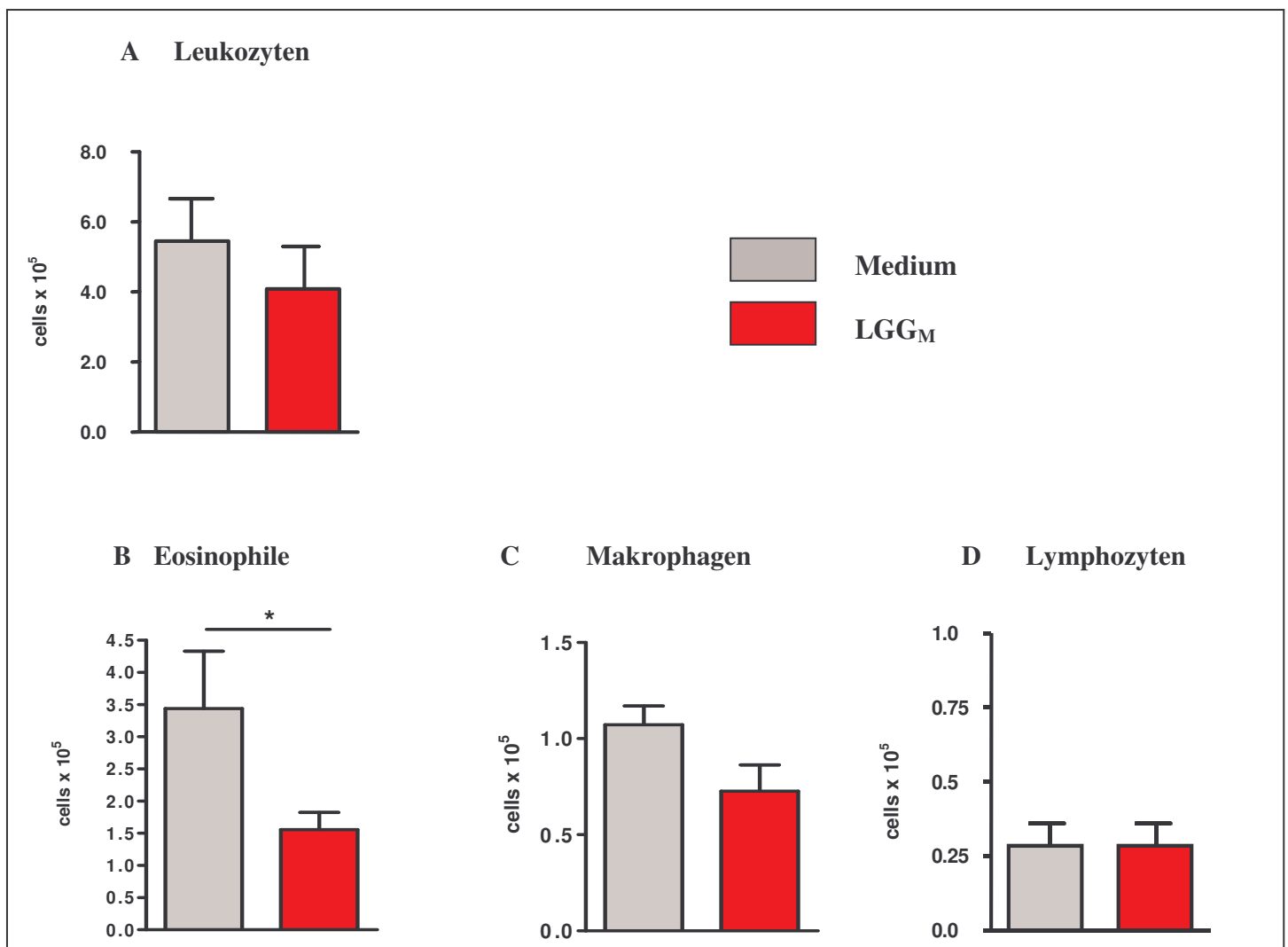


Abb. 12: Leukozytenpopulation in der BAL: In der Gesamtzellzahl der Leukozytenpopulation bei den Nachkommen zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied, wohl aber eine Tendenz in Richtung einer verminderten Zahl bei der Behandlung mit LGG_M. Bei der Analyse der Leukozytensubpopulation zeigte sich bei den Nachkommen von mit LGG_M behandelten Müttern eine signifikante Reduktion der eosinophilen Granulozyten, während die Anzahl der Makrophagen und Lymphozyten keinen Unterschied zu der mit Medium behandelten Kontrollgruppe aufwiesen. (Signifikanzniveau: $p < 0,05^*$)

Nach morphologischen Kriterien wurden dann die verschiedenen Leukozytensubpopulationen aus der BAL differenziert und deren absolute Zahl anhand der Gesamtzellzahl und der prozentualen Anteile der Zellsubpopulationen im Präparat ermittelt. Hierbei wurden eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen unterschieden und jeweils deren absolute Zahl in der BAL angegeben.

Im Ergebnis zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der Gesamtzellzahl der Leukozyten (A), wohl aber eine Tendenz in Richtung einer verminderten Gesamtzellzahl bei Behandlung mit LGG_M. Die Leukozytensubpopulationen zeigen eine signifikant erniedrigte Anzahl an eosinophilen Granulozyten (B) in der perinatal mit LGG_M-behandelten Gruppe. Bei der Anzahl der Makrophagen (C) und der Lymphozyten (D) trat kein signifikanter Unterschied zwischen den Nachkommen der mit LGG_M und Medium behandelten Müttern auf (siehe Abb. 12).

3.1.2.2 Interleukin-5-Konzentration in der BAL

Interleukin-5 ist als TH₂-typisches Zytokin verantwortlich für die Rekrutierung v.a. von eosinophilen Granulozyten. Außerdem trägt es durch das Verhindern der Apoptose wesentlich zum Überleben dieser Zellen im Entzündungsgebiet bei.

Die IL-5-Konzentration in der BAL wurde mittels ELISA bestimmt.

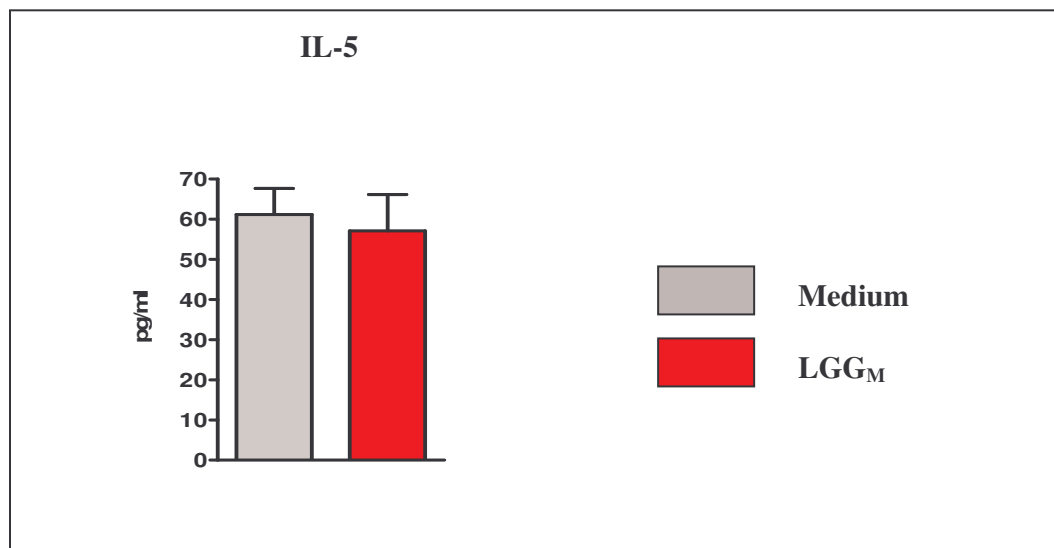


Abb. 13: IL-5-Konzentration in der BAL: Es zeigt sich kein Unterschied in der Konzentration an IL-5 in der BAL zwischen den Nachkommen der mit LGG_M und Medium behandelten Maus-Mütter.

Im Ergebnis zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Konzentration an IL-5 in der BAL zwischen den Nachkommen der mit LGG_M bzw. Medium behandelten Maus-Mütter (siehe Abb. 13).

3.1.3 Lungenhistologie

Neben der Analyse zellulärer Bestandteile aus der BAL lassen sich auch anhand morphologischer Kriterien des Atemwegsepithels bzw. des Lungen-Interstitiums Rückschlüsse auf pathophysiologische Vorgänge wie z.B. mögliche Atemwegsentzündungen ziehen. Hierzu ist die Anfertigung von histologischen Lungenpräparaten notwendig. Bei den mit HE gefärbten Lungenpräparaten zeigten sich deutliche Unterschiede bei der Infiltration durch Entzündungszellen (Abb. 14). Die Bronchien der Nachkommen von mit Medium behandelten Mäusen (B) zeichnen sich durch eine stärkere peribronchiale Infiltration aus als die mit LGG_M behandelten Mausnachkommen (A), die nur eine leichte, deutlich reduzierte Infiltration aufweisen.

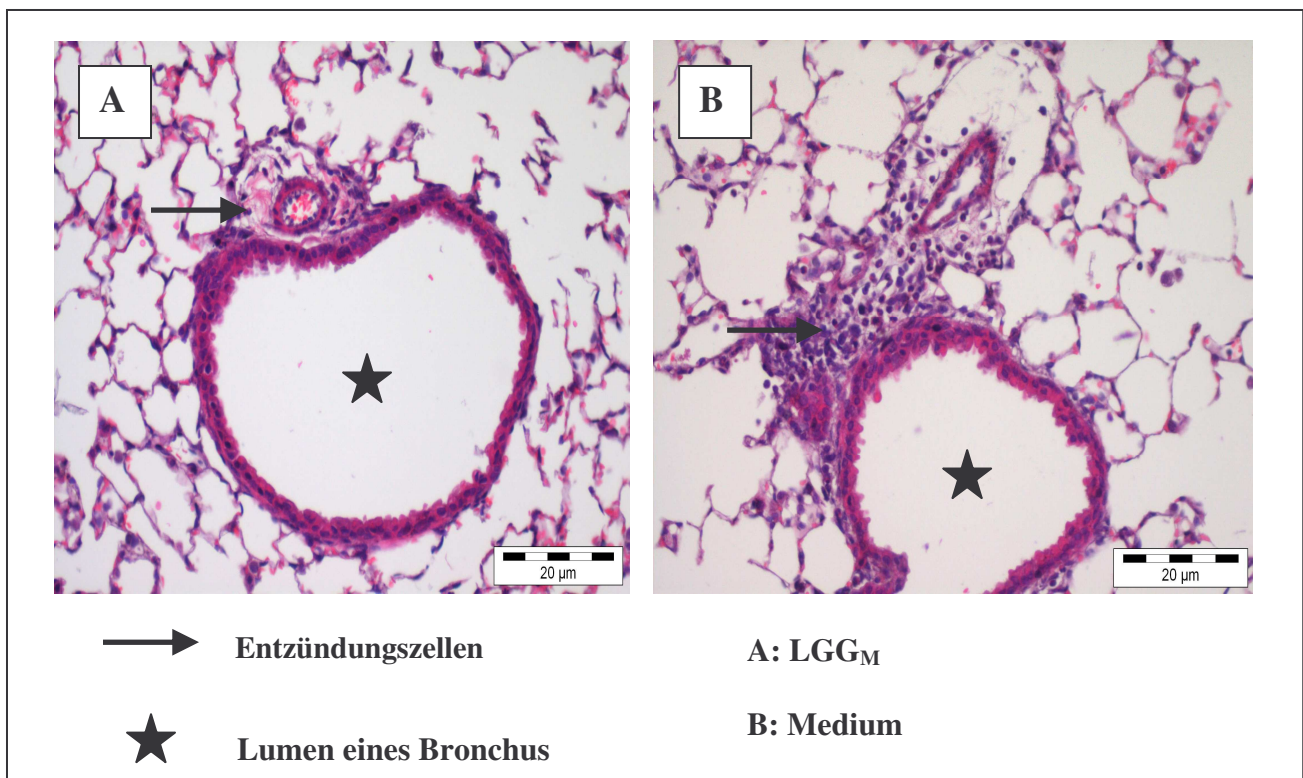


Abb. 14: Repräsentative Darstellung von HE-gefärbten Lungenschnittpräparaten. A: Lungenschnitte der Nachkommen von mit LGG_M behandelten Muttertieren. B: Lungenschnitte der mit Medium behandelten Kontrollgruppe. Es zeigt sich eine deutlich stärkere peribronchiale Infiltration durch Entzündungszellen in der mit Medium behandelten Kontrollgruppe als in der mit LGG_M behandelten Gruppe.

Durch die PAS-Färbung lassen sich Mukusbestandteile, wie Muko- und Glykoproteine und neutrale Mukopolysaccharide, nachweisen. Dieser Mukus findet sich vor allem in den an ihrer charakteristischen Morphologie erkennbaren Becherzellen des Atemwegsepithels. Hier befindet er sich vor allem in der apikalen Hälfte der Zellen und bedingt so ihre charakteristische Form.

Sowohl in den Atemwegen der Nachkommen von mit LGG_M-behandelten Muttertieren (A), als auch in denen der Kontrollgruppe (B), zeigen sich deutlich die mukusproduzierenden Becherzellen. Eine unterschiedliche Anzahl an dieser Zellen kann jedoch nicht beobachtet werden (siehe Abb. 15). Analog zur HE-Färbung wird auch nach PAS-Färbung eine verminderte Zahl an peribronchial gelegenen Entzündungszellen beobachtet.

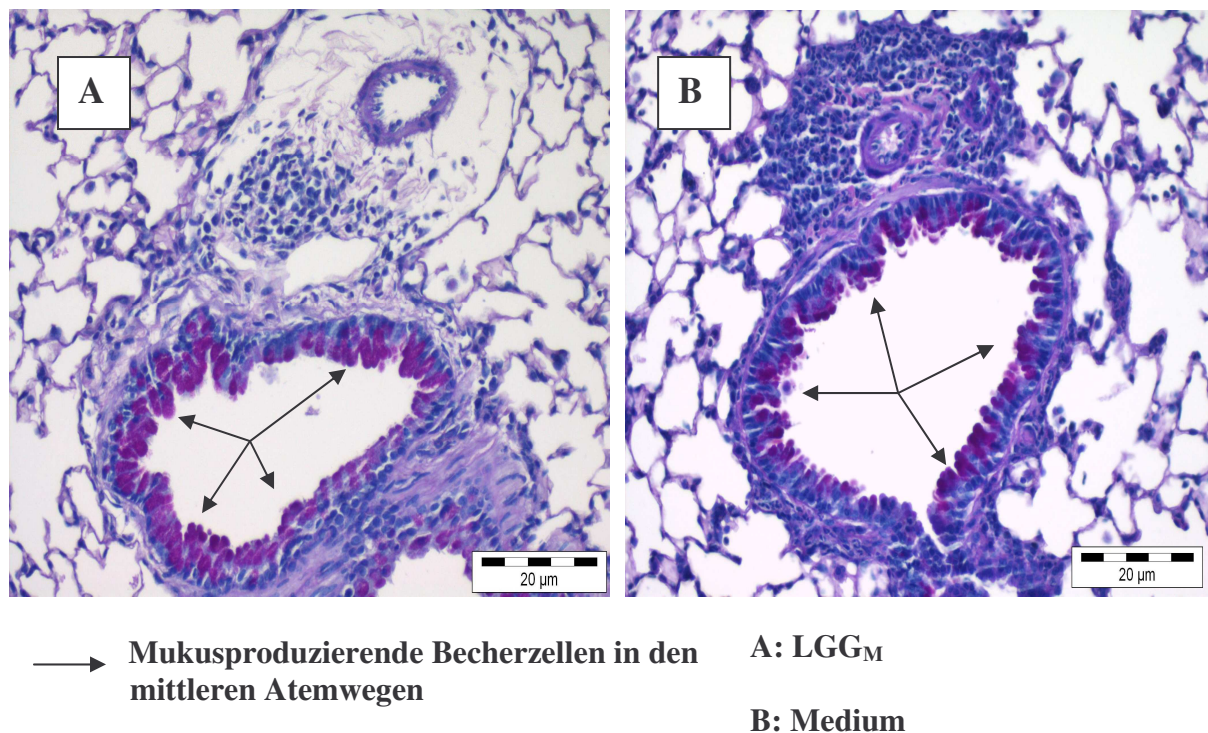


Abb. 15: Repräsentative Darstellung von PAS-gefärbten Lungenschnittpräparaten. Sowohl die Schnittpräparate der Nachkommen von mit LGG_M-behandelten Muttertieren (A), als auch die der Nachkommen von mit Medium behandelten Muttertieren (B) zeigen deutlich das Vorkommen mukusproduzierender Becherzellen. Quantitativ lässt sich jedoch kein Unterschied feststellen. Analog zu den mit HE-gefärbten Schnittpräparaten lässt sich auch hier eine stärkere peribronchiale Infiltration bei der mit Medium behandelten Gruppe durch Entzündungszellen feststellen.

3.1.4 Head-out Body-Plethysmographie

Die Messung der Lungenfunktion mit der Head-out Body-Plethysmographie erfolgte am Tag 48, d.h. 24 Stunden nach der letzten Aerosolbehandlung. Mit dieser Methode lässt sich die Lungenfunktion einer spontan atmenden Maus nicht-invasiv analysieren: Mit einem potenten Bronchokonstriktor (Metacholin) wird eine Dyspnoe erzeugt. Verglichen werden die minimalen Dosen an Metacholin, die zu einer 50%igen Reduktion des Atemflusses benötigt werden (MCH 50). Im Ergebnis konnte kein signifikanter Unterschied des MCH 50 zwischen den Nachkommen der mit LGG_M und der mit Medium behandelten Muttertieren gezeigt werden (siehe Abb. 16).

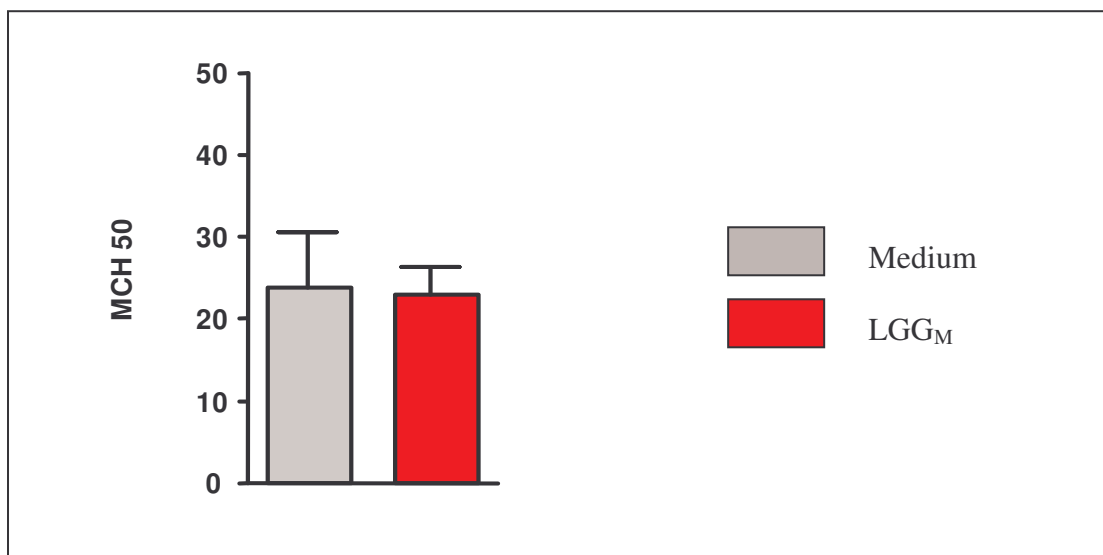


Abb. 16: Lungenfunktion der Nachkommen der mit LGG_M und mit Medium behandelten Mausmütter: Die Lungenfunktion wurde mit der Head-out Body-Plethysmographie analysiert, wobei man die minimalen Dosen an Metacholin, die zu einer 50%igen Reduktion des Atemflusses benötigt wurden (MCH 50), dargestellt sind. Im Ergebnis zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

3.1.5 Zytokinmuster nach in vivo Stimulation mononukleärer Zellen aus der Milz

Da Allergien v.a. auf die Reaktionen von TH₂-Zellen zurückzuführen sind, wurden in diesem Versuch neben dem für TH₁ typischen IFN- γ , die Konzentrationen der für TH₂ typischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sowie IL-10 gemessen.

Zur Analyse der Produktion von Cytokinen wurden den Mäusenachkommen die Milz entnommen und die mononukleären Zellen isoliert. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden mit OVA restimuliert und die Zytokine im Zellkulturüberstand gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt.

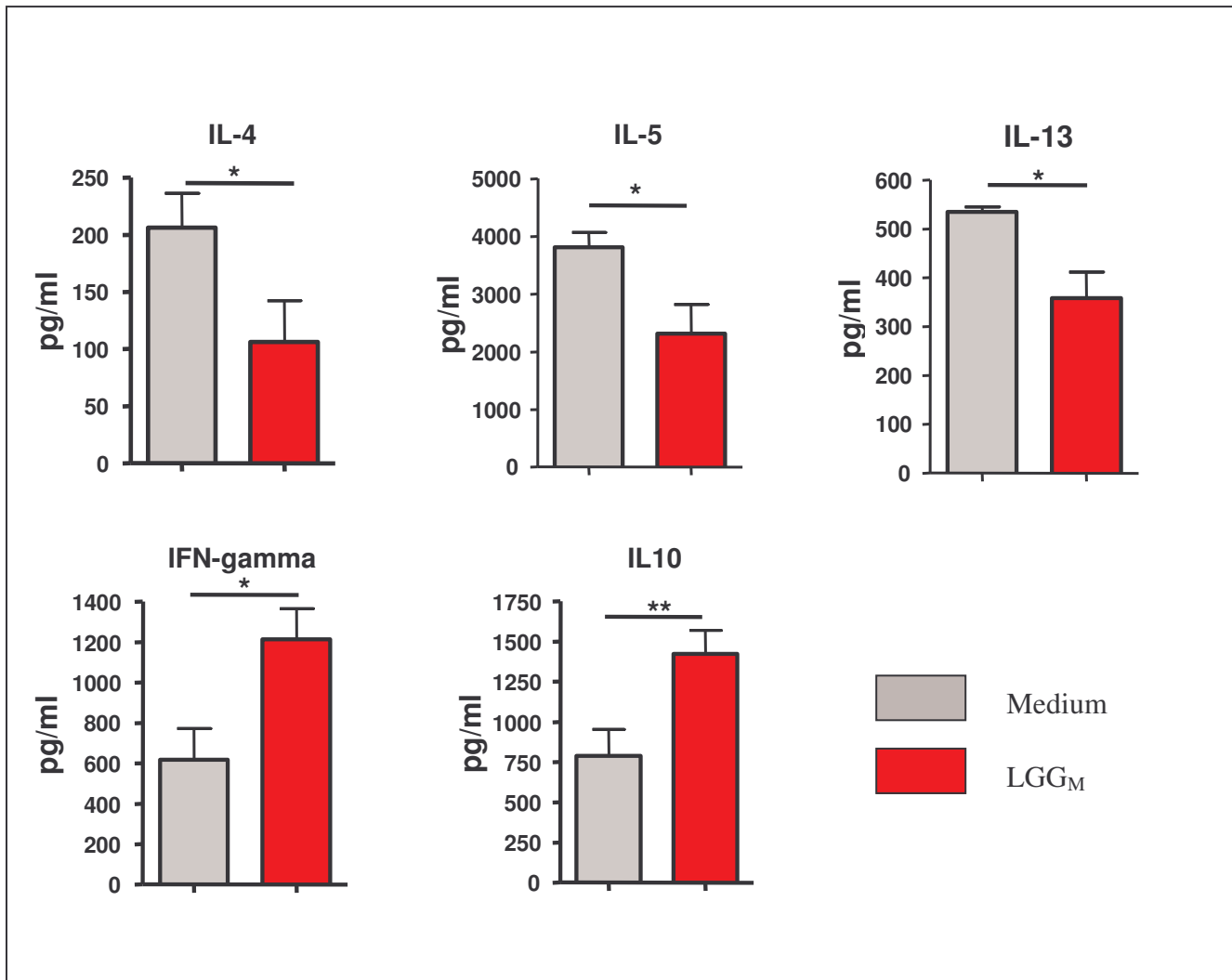


Abb. 17: Mittels ELISA bestimmte Cytokinproduktion von restimulierten MNCs der Milzen von Nachkommen der mit LGG_M und Medium behandelten Müttern. Während unter der Behandlung mit LGG_M die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 signifikant erniedrigt ist, zeigt sich umgekehrt eine signifikante Erhöhung der Zytokine IFN- γ und IL-10 (Signifikanzniveau $p \leq 0,05^*$; $p < 0,005^{**}$).

Es zeigten sich im Ergebnis signifikant erniedrigte Konzentrationen für IL-4, IL-5 und IL-13 sowie eine signifikant erhöhte Produktion der Zytokine IFN- γ und IL-10 bei den Nachkommen der mit LGG_M behandelten Mütter.

3.2 In vitro-Studien

Makrophagen als Zellen des angeborenen Immunsystems vermitteln die erste immunologische Antwort auf bakterielle Einflüsse. Ziel der in vitro Studie war es, regulatorische Effekte des LGG_M auf die murine RAW-Makrophagenzelllinie zu untersuchen. Hierzu wurden je 1×10^6 Zellen mit 100 μ l LGG-konditioniertem Medium für 24 Stunden inkubiert und anschließend die Analyse durchgeführt. Als Kontrollgruppe wurden RAW-Zellen verwendet, die mit dem nicht-konditionierten bakteriellen Wachstumsmedium MRS-Broth (Medium) inkubiert wurden.

3.2.1 Zytokinproduktion nach Behandlung mit LGG_M

Um die Auswirkungen des LGG_M auf die murine RAW-Makrophagenzelllinie zu analysieren, wurde nach einer 24 stündigen Inkubation der Zellen mit Zellkulturmedium, 10% MRS-Broth und 10 % LGG_M der Zellkulturüberstand abgenommen und hieraus mittels ELISA-Technik die Cytokinkonzentration von IL-10, TNF- α sowie IL-6 bestimmt (siehe Abb. 18).

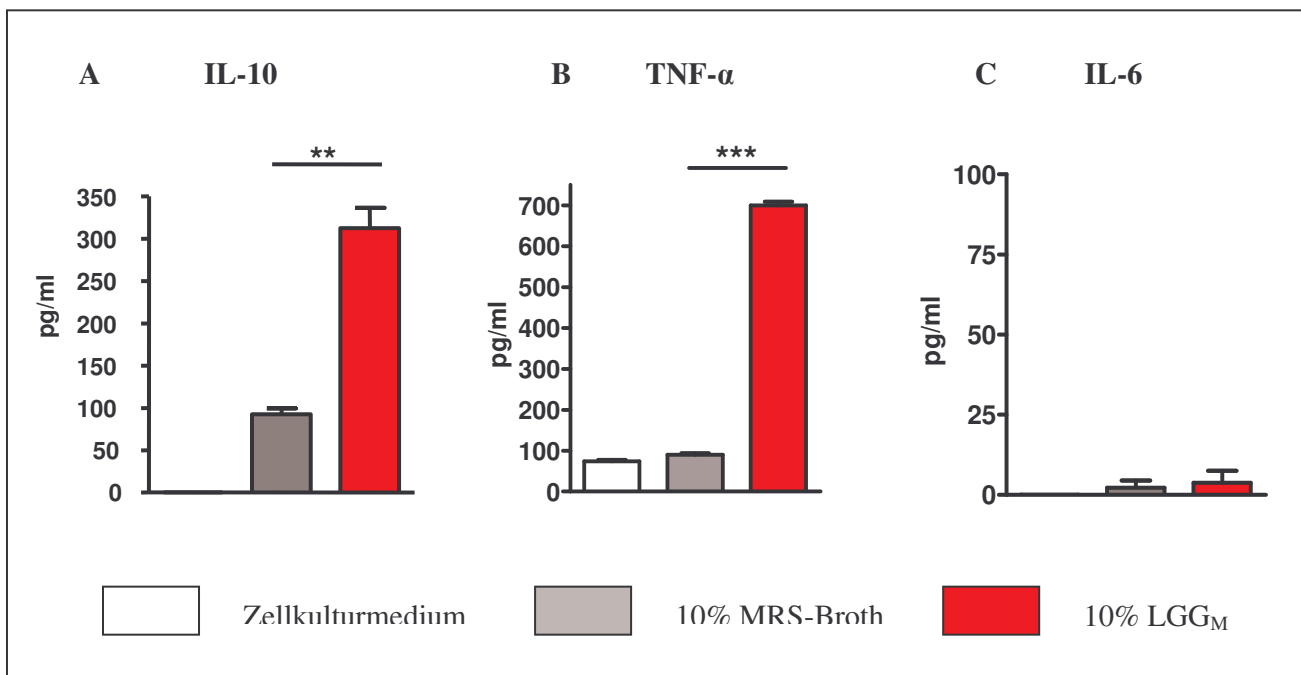


Abb. 18: Zytokinproduktion der Makrophagen nach 24-stündiger Inkubation. 24 Stunden nach Inkubation der RAW-Makrophagen mit Zellkulturmedium, 10% MRS-Broth und 10% LGG_M zeigte sich eine signifikant erhöhte Produktion von IL-10 (A) und TNF- α (B) bei den mit LGG_M-behandelten Zellen, während IL-6 (C) insgesamt nur in sehr geringen Mengen produziert wurde. Die Cytokine wurden mittels ELISA-Technik nachgewiesen. (Signifikanzniveau: $p < 0,005^{**}$, $p < 0,001^{***}$)

Im Ergebnis zeigt sich, dass ein signifikanter Unterschied in der Produktion von IL-10 und TNF- α besteht: LGG_M bewirkt eine wesentlich höhere Produktion dieser Cytokine von den Makrophagen als das Kontrollmedium. Die Expression von IL-6 fiel einheitlich gering aus.

3.2.2 DNase-Behandlung des LGG_M

Um die Frage zu beantworten, welche Faktoren des LGG_M die regulatorischen Effekte verursachen, wurde dieses zunächst einer DNase-Behandlung unterzogen, um möglicherweise enthaltene, immunologisch wirksame DNA abzubauen.

Zur Kontrolle der DNase-Aktivität wurde dem LGG_M ein DNA-Plasmid zugefügt und der Ansatz anschließend mit DNase behandelt. Zum Nachweis eines erfolgreichen enzymatischen Abbaus der DNA wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, wobei die DNA über Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurde (siehe Abb. 19):

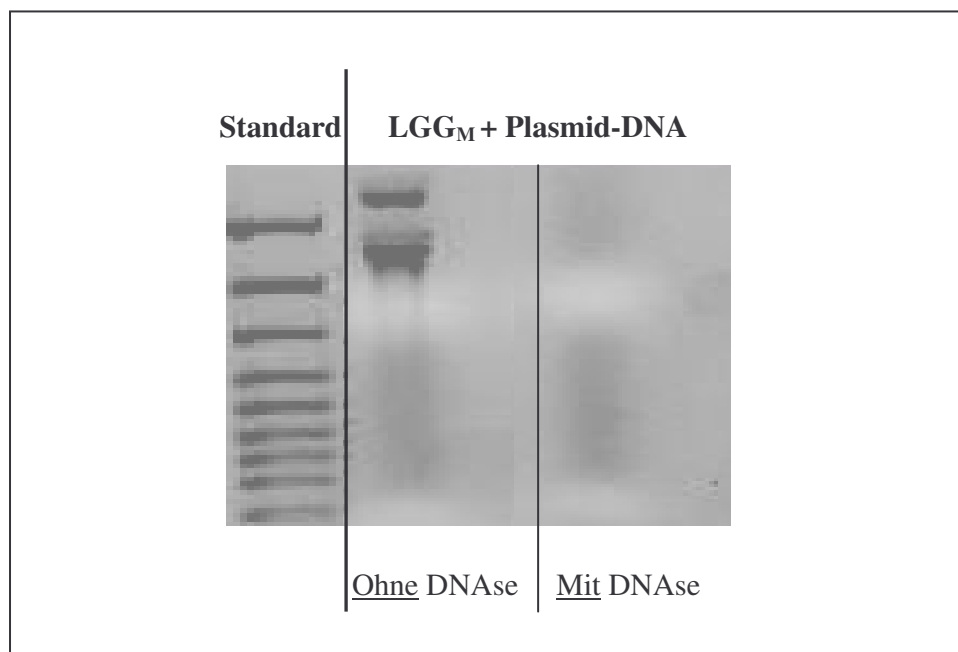


Abb. 19: Kontrolle des enzymatischen Abbaus der DNA durch Behandlung mit DNase. Dem LGG_M wurde ein DNA-Plasmid zugefügt und anschließend eine DNase-Behandlung durchgeführt. Während auf der Gelelektrophorese bei der Probe ohne DNase-Behandlung das Plasmid detektierbar ist, sind bei der mit DNase behandelten Probe lediglich Abbauprodukte zu sehen. Somit wurde die Wirksamkeit der DNase bestätigt und es ist davon auszugehen, dass auch alle Spuren eventuell vorhandener bakterieller DNA komplett abgebaut sind.

Im Ergebnis zeigten sich lediglich Abbauprodukte bei der mit DNase behandelten Probe. Somit konnte die Wirksamkeit der DNase bestätigt werden und es ist davon auszugehen, dass auch alle Spuren eventuell vorhandener bakterieller DNA komplett abgebaut wurden.

3.2.2.1 Zytokinproduktion von RAW-Makrophagen nach Behandlung mit DNA-freiem LGG_M (LGG_{M/ØDNA})

Nach 24 stündiger Inkubation der RAW-Zellen mit LGG_{M/ØDNA} wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Konzentration der Zytokine IL-10 und TNF- α mittels ELISA-Technik bestimmt (siehe Abb. 20):

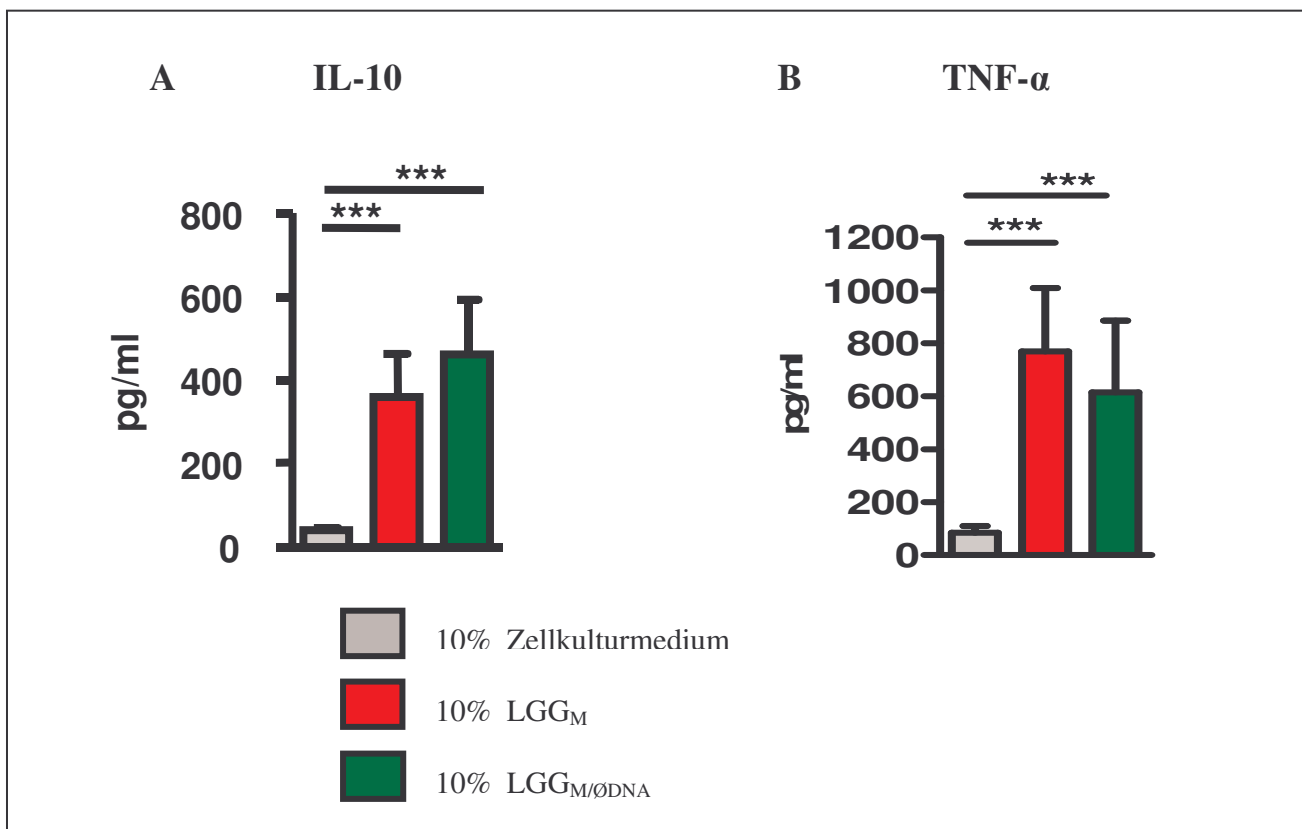


Abb. 20: Produktion von IL-10 (A) und TNF- α (B) durch RAW-Makrophagen nach Stimulation mit LGG_M und LGG_{M/ØDNA}.

Nach 24-stündiger Inkubation wurden mittels ELISA-Technik die Konzentrationen der beiden Zytokine ermittelt. Im Ergebnis zeigt sich zwar eine deutlich signifikant erhöhte Produktion der Zytokine im Vergleich zur Kontrolle (Zellkulturmedium), jedoch unterscheiden sich hierbei LGG_M und LGG_{M/ØDNA} nicht signifikant voneinander. (Signifikanzniveau: $p < 0,001^{***}$)

Im Ergebnis zeigt sich, dass kein signifikanter Einfluss potentiell vorhandener bakterieller DNA auf die Produktion beider Zytokine vorliegt: Sowohl bei der Behandlung mit LGG_M, als auch mit LGG_{M/ØDNA} tritt zwar eine deutlich erhöhte Produktion der Zytokine im Vergleich zur Kontrolle auf, jedoch unterscheiden sich die Gruppen nicht signifikant voneinander.

3.2.3 Proteinasebehandlung des LGG-konditionierten Zellkulturmediums

Da neben Nucleinsäuren auch Proteine für die beobachteten Effekte verantwortlich sein können, wurde das LGG_M einer Proteinasebehandlung unterzogen, um dann die Rolle von ins Medium sezernierten Proteinen zu analysieren.

Um die proteolytische Wirkung der Proteinase zu überprüfen, wurden LGG_M mit Albumin versetzt (2 x 2,5 µg Albumin bzw. 2 x 5 µg Albumin in 1 ml LGG_M) und diese anschließend mit Proteinase-K behandelt (Kontrolle: ohne Proteinasebehandlung) und für 2 bzw. 6 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Proteinase mit einem vom Hersteller mitgelieferten Proteinase-Inaktivierungs-Kit inaktiviert. Hieran schloss sich eine Gelelektrophorese an, um die Albumin-Proteine über eine Comassie-Blue Färbung sichtbar zu machen (siehe Abb. 21):

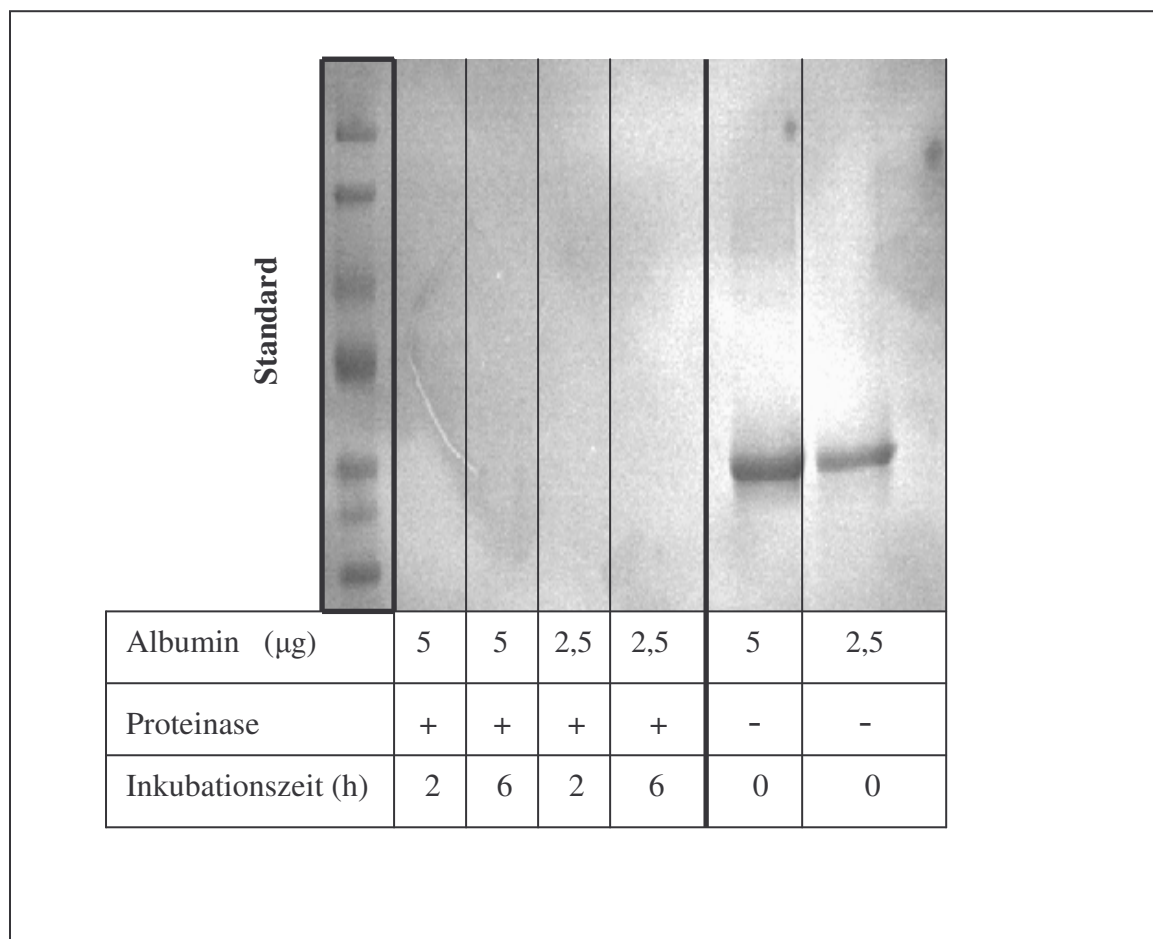


Abb. 21: Nachweis der effektiven Proteinase-Behandlung des LGG_M mittels Gelelektrophorese und anschließende Comassie-Blue Färbung des mit Albumin versetztem LGG_M (2,5 bzw. 5 µg pro 1 ml LGG_M) mit, sowie ohne Proteinasebehandlung. In den mit Proteinase behandelten Proben ist das Albumin degradiert, während die ohne Proteinase-K behandelten Proben deutliche Banden aufzeigen.

Im Ergebnis zeigt sich die Aktivität der Proteinase deutlich: In den mit Proteinase behandelten Proben ist das Albumin vollständig degradiert, während die Proben ohne Proteinase deutliche Banden aufzeigen. Es ist also davon auszugehen, dass auch alle von LGG in das Medium sezernierten Proteine komplett abgebaut sind.

3.2.3.1 Zytokinproduktion von RAW-Makrophagen nach Behandlung mit Protein-freiem LGG_M (LGG_{M/ØProtein})

Nach 24 stündiger Inkubation der RAW-Zellen mit LGG_{M/ØProtein} wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Konzentration der Cytokine IL-10 und TNF- α bestimmt (siehe Abb. 22):

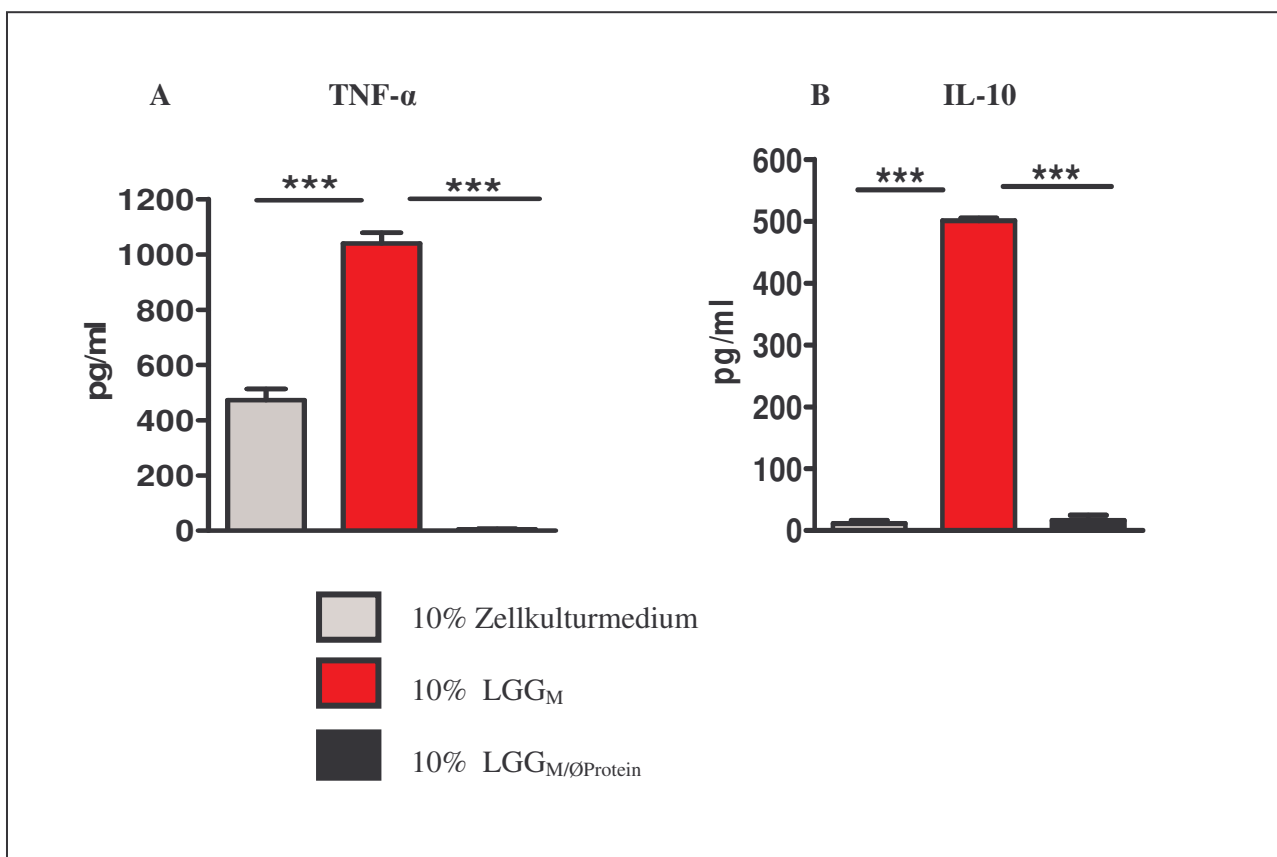


Abb. 22: TNF- α (A) und IL10-Freisetzung (B) von RAW-Makrophagen nach Behandlung mit LGG_{M/Øprotein} und LGG_M. Die Produktion beider Cytokine ist nach Inkubation mit LGG_{M/ØProtein} signifikant erniedrigt. (Signifikanzniveau: $p < 0,001^{***}$)

Mit deutlicher Signifikanz ($p < 0,001^{***}$) unterscheiden sich die Produktionsmuster beider Cytokine im Ergebnis: Während das LGG_M den erwarteten Anstieg der Zytokine zeigt, ist die Konzentration bei Behandlung mit LGG_{M/Øprotein} signifikant reduziert ($p < 0,001^{***}$). Es ist also zu

erwarten, dass die für immunmodulatorische Effekte verantwortliche Substanz Proteinase-sensibel ist.

3.2.4 RNA-Isolierung aus mit LGG_M- und LGG_{M/ØProtein}-behandelten RAW-Makrophagen

Um eine eventuell vorhandene Restaktivität der Proteinase-K und hiermit eine im Ergebnis verfälschte Cytokinkonzentration sicher ausschließen zu können, wurde die Immunantwort der RAW-Makrophagen auch auf transkriptioneller Ebene nachvollzogen. Dazu wurde aus RAW-Zellen nach Stimulation RNA isoliert, hieraus cDNA hergestellt und in den darauffolgenden

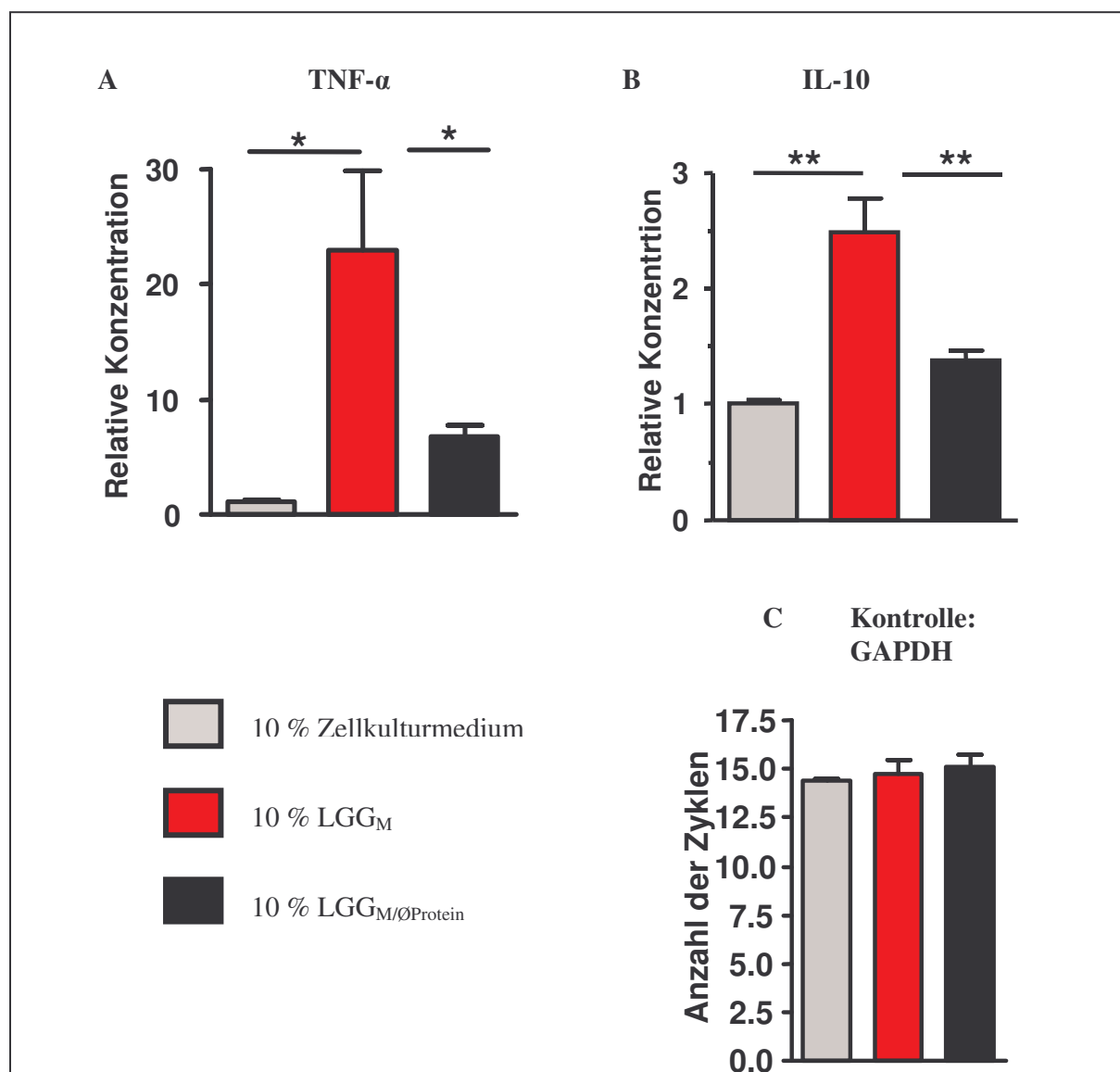


Abb. 23: Einfluß von LGG_{M/ØProtein} auf die Zytokin-Genexpression von RAW-Makrophagen. Relative Konzentrationen der für die Zytokine TNF- α (A) und IL-10 (B) spezifischen RNA nach Stimulation von RAW-Makrophagen mit LGG_M und LGG_{M/ØProtein}. Mit LGG_{M/ØProtein} stimulierte RAW-Makrophagen zeigen eine verminderte mRNA-Expression beider Zytokine. Die Konzentration wurde relativ zum Haushaltsgen GAPDH (C) angegeben. (Signifikanzniveau $p \leq 0,05^*$; $p < 0,005^{**}$).

Schritten mittels Real-time-PCR amplifiziert und anschließend quantitativ ausgewertet. Die mRNA-Expression des Haushaltsgens GAPDH war in allen Gruppen identisch. Die mRNA-Expression von TNF- α und IL-10 ist relativ dazu angegeben (siehe Abb. 23).

Auch auf transkriptorischer Ebene konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der RAW-Makrophagen mit LGG_{M/Øprotein} eine signifikant verminderte Expression der TNF- α - und IL-10-spezifischen RNA zur Folge hat. Ein falsch-positives Ergebnis der Proteinase-Behandlung aufgrund nachträglichen Verdauens der Zytokine durch eine Restaktivität der Proteinase konnte somit ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

Unter Allergie wird eine Dysregulation des Immunsystems verstanden, bei der es zu spezifischen Reaktionen gegen normalerweise harmlose Antigene kommt. Die Manifestation dieser Hypersensibilität zeigt sich in den unterschiedlichsten Symptomen: So werden z.B. relativ harmlose Symptome wie Rhinokonjunktiviten oder Pruritus beobachtet, potentiell lebensbedrohliche Formen, wie es z.B. das Asthma bronchiale zeigt, gehören jedoch ebenso hierzu.

Allergien zählen heute zu den häufigsten und volkswirtschaftlich wichtigsten Erkrankungen Europas. Wichtig insbesondere auch deshalb, da gerade Kinder, Jugendliche und häufig auch Menschen im Berufsleben betroffen sind. Es ist also auch von größtem sozioökonomischem Interesse, nach neuen Möglichkeiten zur Prävention und Therapie dieser Erkrankung zu suchen.

Die Forschung beschäftigt sich aktuell unter anderem mit den prä- und frühen postnatalen Einflüssen auf die Entstehung von Allergien. So soll die vorliegende Arbeit zeigen, wie gezielte Ernährungseinflüsse während der Schwangerschaft die Toleranzmechanismen gegenüber Allergenen in den Nachkommen beeinflussen kann.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert einerseits den immunregulatorischen Einfluß von LGG_M auf die Entstehung von Allergien im Mausmodell. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei den Nachkommen der perinatal mit LGG_M behandelten Muttertiere einige für allergische Reaktionen typische Charakteristika vermindert werden konnten. So zeigte sich z.B. sowohl in der BAL eine deutlich reduzierte Zahl an eosinophilen Granulozyten, als auch eine geringere peribronchiale Infiltration durch Entzündungszellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Desweiteren zeigte die Restimulation von mononukleären Zellen der Milz mit LGG_M signifikant erhöhte Konzentrationen an IFN- γ .

In vitro-Untersuchungen zur Differenzierung therapeutisch wirksamer Bestandteile des LGG_M mit einer Makrophagenzelllinie zeigten, dass Proteinase-sensitive Moleküle für die immunregulatorischen Effekte mitverantwortlich zu sein scheinen.

4.1 Effekte des LGG_M auf die Entwicklung von Immunantworten in den Nachkommen

In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass probiotische Bakterien einen positiven Effekt sowohl in der Prävention, als auch in der Behandlung von manifesten allergischen Erkrankungen zeigen, sofern sie zu einem möglichst frühen Zeitpunkt begonnen wird (Feleszko al. 2007; Wang et al. 2004; Helin et al. 2002; Majama et Isolauri 1997). Um die immunologischen Vorgänge jedoch im Detail klären zu können, spielen Tierversuche eine wichtige Rolle. Zwar kann das Immunsystem einer Maus das eines Menschen nicht in allen Details widerspiegeln, es bestehen dennoch grundlegende immunologische Übereinstimmungen in Bezug auf die molekularen Mechanismen bei der Entstehung und Manifestation von allergischen Erkrankungen. Daher können die im Mausmodell erzielten Ergebnisse nicht direkt in die humane Situation übertragen werden, geben aber entscheidende Anhaltspunkte für mögliche Mechanismen der Allergieprävention auch beim Menschen.

Es zeigten sich keine Unterschiede der Serumkonzentrationen von IgG_{2a}, IgG₁ und IgE zwischen den Nachkommen von LGG_M-behandelten Müttern und der Kontrollgruppe.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen ähnlicher Studien, die unter einer probiotischen Therapie von Müttern zwar eine Reduktion allergischer Symptome bei den Nachkommen erreichten, jedoch im Hinblick auf die Sensibilisierung, sowohl auf humaner wie auf tierexperimenteller Ebene, keine Reduktionen nachweisen konnten (Blümer et al. 2007; Kalliomäki et al. 2001). So wurden zwar sowohl im Maus- als auch im Humanexperiment deutlich weniger Manifestationen von Allergien beobachtet, die Voraussetzung einer Allergie jedoch, nämlich die Sensibilisierung des Organismus, wie sie durch den Nachweis allergenspezifischer Antikörper nachgewiesen wird, konnte nicht verhindert werden. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, dass ähnliche Beobachtungen auch bei Kindern von Bauernfamilien gemacht wurden: So zeigen eben solche Kinder signifikant weniger allergische Manifestationen wie Asthma, Rhinitis oder atopischer Dermatitis im Vergleich zur Kontrollgruppe z.B. aus „Stadtfamilien“ und zwar unabhängig von der allergischen Sensibilisierung (Riedler et al. 2001)

Die vorliegende Studie konnte eine Suppression TH₂-gesteuerter, allergen-induzierter Immunantworten durch eine LGG_M-Behandlung nachweisen.

So wurde in der BAL eine deutlich verminderte Anzahl von eosinophilen Granulozyten, welche typisch für eine allergische pulmonale Manifestation sind (Tan et al. 2007), gefunden. Interessanterweise zeigten die Konzentrationen des ebenfalls in der BAL bestimmten IL-5 keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Da IL-5 als wichtigstes Zytokin für die Produktion, Differenzierung, Rekrutierung, Aktivierung und Lebensdauer von eosinophilen Granulozyten gilt (Simon et al. 2007; Gleich, 2000), sollte eine Verminderung der Anzahl mit einer erniedrigten IL-5-Konzentration korrelieren. Dass es dennoch zu keinem Unterschied zwischen den Gruppen kam, kann möglicherweise durch folgende, durch die Kinetik bedingte Ursache erklärt werden: Jing et al. konnte zeigen, dass ein Abfall der IL-5-Konzentration in den BAL OVA-sensibilisierter Mäuse etwa 12 Stunden nach Behandlung eintrat und 24 Stunden später annähernd Konzentrationen vorlagen, die vor der Behandlung herrschten. Die Zahl der Eosinophilen im Lungengewebe hingegen erreichte erst nach 12 Stunden den Höhepunkt, um dann für weitere 24-48 Stunden auf diesem Niveau zu verbleiben (Jing et al. 2005). Da in der vorliegenden Studie der Fokus auf die Charakterisierung eines allergischen Phänotyps lag, wurde die Analyse der Tiere etwa 48 Stunden nach der letzten OVA-Behandlung durchgeführt. Es ist zu vermuten, dass zu einem früheren Zeitpunkt unterschiedliche Konzentrationen von IL-5 in der jeweiligen Gruppe vorgelegen haben könnten.

Die Lungenhistologie zeigte im Ergebnis eine deutlich geringere peribronchiale Infiltration durch Entzündungszellen bei den Nachkommen LGG_M-behandelter Muttertiere und bestätigt somit das Ergebnis der BAL. Aufgrund morphologischer Kriterien wie Kernform, Granula, Größe und Zytoplasmafärbung handelt sich bei den Infiltraten wahrscheinlich im wesentlichen um eosinophile Granulozyten, die als Hauptbestandteil einer pulmonalen Infiltration bei allergischen Erkrankungen bekannt sind (Hogan et al. 1997). Weiterhin spricht für eine Infiltration durch Eosinophile Granulozyten, dass in der BAL beider Gruppen die Zahl der Makrophagen und der Lymphozyten keine Unterschiede aufwiesen.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen sollte auch eine verminderte Atemwegshyperreagibilität (AHR) zu verzeichnen sein. Dass sich in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Unterschiede zwischen den MHC₅₀-Werten aufzeigen ließen, steht wiederum im Einklang mit den Ergebnissen von Blümer et al., die bei LGG-Behandlung der Muttertiere ebenfalls keine Unterschiede in der AHR nachweisen konnten (Blümer et al., 2007). Diese Dissoziation zwischen bronchialer Inflammation und AHR bei allergischem Asthma könnte auch auf humaner Ebene beobachtet werden. So zeigten z.B. Crimi et al. keine signifikante

Reduzierung der AHR bei Patienten mit allergischem Asthma, obwohl signifikante Unterschiede bezüglich der bronchialen Inflammation bestanden (Crimi et al., 1998).

Bei der Analyse der Cytokine OVA-restimulierter Milzzellen zeigte sich, dass eine signifikant höhere Konzentration an IFN- γ im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen war. IFN- γ spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer naiven T-Helferzelle hin zur TH₁-Zelle und der Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen. Außerdem ist es ein potenter Suppressor der Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu TH₂-Zellen (Romagnani 2006, Leonardo et al. 2005). In einer Linie hierzu stehen auch die signifikant erniedrigten Werte für IL-4, IL-5 und IL-13. Als Hauptzytokine für eine TH₂-gewichtete Immunreaktion ist also von einer Unterdrückung pro-allergischen Reaktionen auszugehen.

Die erhöhte IFN- γ -Produktion steht somit im Einklang mit den vorangegangenen Ergebnissen. IFN- γ supprimiert eine durch TH₂-Zellen bedingte pulmonale Infiltration durch eosinophile Granulozyten. Es stellt sich die Frage, ob ein pathologisch erniedrigter IFN- γ -Spiegel und dadurch eine TH₂-Dominanz vor der Behandlung der Tiere herrschte, oder eine TH₂-Dominanz bei normalem IFN- γ -Spiegel für die Effekte verantwortlich ist. Klinisch gesehen ist diese Frage insofern interessant, als dass sich unterschiedliche Therapiekonzepte ableiten ließen, wie etwa eine Reduktion allergischer Erkrankungen durch therapeutische IFN- γ -Erhöhung oder durch direkte TH₂-Supprimierung. Für die Hypothese, dass eine erniedrigte IFN- γ -Sekretion bei der allergischen TH₂-Dominanz ebenfalls eine Rolle spielt, spricht z.B. die Beobachtung, dass Kinder mit allergischen Erkrankungen eine verminderte IFN- γ -Produktion aufweisen (Pohjavouri et al. 2004, Tang et al. 1995). Außerdem konnten Smart et al. zeigen, dass, unter Provokation mit Hausstaubmilben, Patienten mit allergisch bedingten Asthma im Vergleich zur Kontrollgruppe mit gesunden Patienten und denen mit in der Remission befindlichen Asthma, signifikant reduzierte IFN- γ -Spiegel aufwiesen. Weiter wurde gezeigt, dass sich die IFN- γ -Spiegel der beiden zuletzt genannten Gruppen sogar gleichen (Smart et al. 2002). Man kann also davon ausgehen, dass pathologisch reduzierte IFN- γ -Konzentrationen großen Einfluss auf eine allergische Manifestation haben können.

Smart et al. konnten weiter zeigen, dass sowohl die Gruppe mit andauerndem Asthma, als auch die mit der sich in Remission befindlichem Asthma, gleiche Konzentrationen des für eine TH₂-Reaktion typischen IL-5 bei Allergenprovokation zeigten. Ein Abfall der IL-5-Konzentration scheint also nicht unbedingt notwendig zu sein, um eine Manifestation des allergischen Asthmas zu unterbinden. Unterstützt wird diese These auch durch die Beobachtungen von Leckie et al., die zeigen, dass eine Therapie mit IL-5-Antikörpern zwar

die Zahl der Eosinophilen reduziert, aber keinen Einfluss auf die spätere Manifestation eines allergischen Asthmas hat (Leckie et al. 2000)

Es bleibt demnach festzuhalten, dass eine Erhöhung des IFN- γ -Spiegels in den Nachkommen von LGG_M-behandelten Muttertieren zur Aktivierung von TH₁-Mechanismen führt, die die allergische Manifestation supprimieren können.

Da bereits in ähnlichen Studien gezeigt werden konnte, dass eine maternale LGG-Behandlung mit anti-allergischen Effekten unter anderem zu einer verminderten IL-10-Konzentration in den restimulierten Milzzellen der Nachkommen führte (Blümer et al. 2007), steht das vorliegende Ergebnis im Gegensatz zu früheren Beobachtungen. Ähnliche Diskrepanzen konnten auch auf humaner Ebene beobachtet werden. Hier standen erhöhte IL-10-Konzentrationen sowohl mit pro-allergischen, als auch anti-allergischen Effekten im Zusammenhang (Pierkes et al. 1999; Mäkelä et al. 2000; Yang et al. 2000).

Interleukin-10 kann nicht explizit einer bestimmten T-Zell-Subpopulation zugeordnet werden. Es wird sowohl von TH₁-, TH₂-, als auch von T_{Reg}-Zellen produziert. Es fördert auf der einen Seite z.B. die Differenzierung naiver TH-Zellen hin zu pro-allergischen TH₂-Zellen. Andererseits ist es aber auch Haupt-Cytokin Typ 1 regulatorischer T-Zellen (T_{Reg}-1), die eine TH₂-Immunantwort wiederum supprimieren können (Elkord 2006; Robinson et al. 2004). Es stellt sich nun die Frage, ob und wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Einklang mit einer deutlich erhöhten Produktion von IL-10 nach LGG_M-Behandlung der Mütter zu bringen ist.

Es wurde bereits gezeigt, dass eine TH₂-Antwort der Nachkommen von LGG_M behandelten Müttern vermindert werden konnte. Somit ist eine durch TH₂-Zellen bedingte Erhöhung der IL-10-Konzentration unwahrscheinlich. Die erhöhten IL-10-Konzentrationen können vielmehr im Zusammenhang mit einer erhöhten Aktivität von T_{Reg}-1-Zellen stehen, die hemmend auf die Differenzierung von pro-allergischen TH₂-Zellen wirken (Taylor et al., 2004; Akdis et al., 2004). Im Zusammenhang mit den erhöhten IFN- γ -Spiegeln der Nachkommen von LGG_M behandelten Müttern, ist auch auf TH₁-Ebene eine Einflussnahme von T_{Reg}-1-Zellen wahrscheinlich. So könnten die in den Nachkommen von LGG_M behandelten Müttern erhöhten IFN- γ -Spiegel das Resultat einer durch T_{Reg}-1-Zellen bedingten Suppression der TH₂-Dominanz sein, wodurch die primär pathologisch verminderte TH₁-Antwort ausgeglichen wird.

Um aussagekräftigere Ergebnisse in Bezug auf die Rolle von T_{Reg}-1-Zellen zu erhalten, die Hinweise auf die immunologische Situation der Versuchstiere geben, wären z.B. Versuche

mit Mäusen denkbar, deren Immunantworten nicht in eine T_{Reg}-1-Richtung geprägt werden können. Diese Immunsupprimierung wäre z.B. IL-10-neutralisierende Antikörper denkbar.

Es bleibt demnach abschließend festzuhalten, dass durch eine maternale LGG_M-Behandlung perinatal zwar die klinische Manifestation einer Allergie in den Nachkommen zumindest abgeschwächt werden kann, eine Sensibilisierung scheint jedoch nicht verhindert zu werden.

4.2 Differenzierung von immunmodulatorisch wirksamen Bestandteilen des LGG_M

Die von Pena et al. beschriebene zellkontakt-unabhängige (Pena et al. 2002), immunmodulatorische Wirkung des LGG_M konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden: Es konnten sowohl signifikante Unterschiede in der Manifestation von Allergien in den Nachkommen von perinatal mit LGG_M-behandelten Müttern im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-10 und TNF- α im in-vitro Versuch beobachtet werden.

Ziel des in-vitro Ansatzes war es, immunmodulatorisch wirksame Komponenten des LGG_M zumindest eingrenzen zu können. Besonders im Hinblick auf pharmakologische Anwendungen des LGG_M für den Menschen ist es von Interesse, die immunmodulatorisch wirksamen von den nicht wirksamen Bestandteilen des LGG_M zu isolieren, z.B. um mögliche Verursacher von Nebenwirkungen zu eliminieren oder Dosierungen bzw. Applikationen zu erleichtern.

Zur Differenzierung wurden potentiell immunmodulatorisch wirksame Bestandteile wie z.B. bakterielle DNA-Fragmente oder Proteine des LGG_M entfernt und anschließend in Zellkultur an einer murinen Makrophagenzelllinie die Auswirkung auf die Freisetzung von IL-10 bzw. TNF- α untersucht. IL-12 und IL-6 wurden, wie bei vorhergehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigt (Dicke, 2007), von der verwendeten Makrophagenzelllinie nicht produziert, sodass im Verlauf lediglich die zwei o.a. Zytokine bestimmt wurden.

Beobachtungen zahlreicher Studien zeigen, dass bakterielle DNA enorme immunmodulatorische Wirkung über die Aktivierung antigenpräsentierender Zellen (APCs) ausüben kann (Tse et Horner 2007, Huazhang et al. 2002, Horner et al. 2001). In diesem Zusammenhang kommt dem unter anderem von APCs exprimierten Toll-like-Rezeptor (TLR)-9 eine besondere Rolle zu, da TLR-9 als Rezeptor identifiziert werden konnte, dessen

typischer Ligand unmethylierte CpG-Motive sind und dessen Aktivierung eine proinflammatorische Cytokinantwort nach sich zieht (Krieg 2002). Es wäre also denkbar, dass die bakterielle DNA von zugrunde gegangenen Laktobazillen im Überstand eine TH₁-gewichtete maternale Immunitätslage induzieren könnte, die letztendlich auch Einfluss auf die Manifestation von Allergien in den Nachkommen nehmen kann.

Da ein im LGG_M vorhandener Pool von Laktobazillen-spezifischer CpG-DNA nicht unwahrscheinlich ist, wurde zunächst ein Versuch unternommen, bei dem LGG_M von potentiell vorhandener DNA befreit und hiermit anschließend die Makrophagenzelllinie behandelt wurde. Die suffiziente Aktivität der DNase bestätigte die im Vorfeld durchgeführte Gelelektrophorese.

Da im Ergebnis weder signifikante Unterschiede noch Tendenzen nach der DNase-Behandlung bei dem von Makrophagen produzierten IL-10 und TNF- α nachgewiesen wurde, ist eine Beteiligung von bakterieller DNA an den im Tierversuch nachgewiesenen immunmodulatorischen Eigenschaften des LGG_M unwahrscheinlich.

Da es sich bei den immunregulatorisch wirksamen Substanzen nicht um DNA handelt, wurde in dieser Arbeit ferner untersucht, ob es sich um Proteine bzw. Peptide handeln könnte. Dazu wurde LGG_M einer Proteinase-Behandlung unterzogen, um es von eventuell vorhandenen Proteinen zu befreien. Anschließend wurde eine Makrophagenzelllinie mit dem von Proteinen befreiten LGG_M behandelt und hiernach die Konzentrationen von TNF- α sowie IL-10 gemessen.

Im Ergebnis zeigte sich nach Proteinase-Behandlung des LGG_M eine signifikant erniedrigte Konzentration an TNF- α sowie IL-10 nach Stimulation der Makrophagen. Um einen Messfehler auszuschließen, der auf einer eventuell noch aktiven Restproteinase im LGG_M zurückzuführen wäre, die auch die Proteine TNF- α und IL-10 degradieren könnte, wurde auch auf transkriptioneller Ebene eine signifikant verminderte Expression von TNF- α - und IL-10-spezifischer RNA gezeigt.

Proteinasesensible Substanzen, das heißt Makromoleküle mit Protein- bzw. Peptidbestandteilen, spielen ebenfalls eine wichtige Rolle als mögliche Liganden von TLRs. Da es sich bei dem im Versuch eingesetzten Laktobazillus um ein Gram-positives Bakterium handelt, sollten auch die hierfür spezifischen Zellwandbestandteile, welche z.B. durch Zelluntergang in den Überstand gelangen, als mögliche immunmodulatorische Substanzen in Erwägung gezogen werden: So konnten bereits Zellwandkomponenten identifiziert werden, die als PAMPs durch TLRs erkannt werden. Hierzu gehören u.a. Peptidoglykane und

Lipoteichonsäuren, die über die Aktivierung des TLR-2 eine proinflammatorische Antwort verursachen (Matsuguchi et al. 2003). Denkbar wäre weiter auch eine proteinaseabhängige Inaktivierung von Hitzeschockproteinen (Hsp) wie Hsp 60 oder Hsp70, die über eine TLR-4-Aktivierung von APCs eine proinflammatorische Antwort initiieren (Bauer et al. 2007).

Selbstverständlich könnten auch vom Bakterium aktiv sezernierte proteinasesensible Produkte als PAMP eine TLR-Aktivierung und somit einen immunmodulatorischen Effekt bewirken (Illiev et al. 2005). Nicht auszuschließen sind selbstverständlich auch Effekte von PAMPs, die unabhängig von TLRs eine Zellaktivierung bewirken könnten.

Welche Substanz(en) für die verminderte Produktion der von den Makrophagen sezernierten Cytokine letztendlich verantwortlich ist, muß in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. So könnten z.B. Versuche mit einer Selektion nach Molekülgröße weiteren Aufschluss über die mögliche immunmodulatorisch wirksame Substanz ergeben und somit letztlich den Weg ebnen, um einen letztendlich aktiven Wirkstoff zu isolieren.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblicke

Die im Tierversuch nachgewiesenen immunmodulatorischen Effekte von LGG_M auf die Nachkommen perinatal behandelter Mütter zeigen die deutliche Reduktion allergischer Manifestationen. Hiermit konnte gezeigt werden, dass ohne das Vorhandensein vitaler Bakterien, die immer auch Gefahren möglicher pathologischer Reaktionen bergen, eine zellkontaktunabhängige Wirkung erzielt werden kann.

Die Sensibilisierung der Nachkommen und somit der Grundstein einer Allergie wird allerdings nicht beeinflusst.

Wie genau die Manifestation von Allergien bereits durch perinatale Expositionen beeinflusst wird, könnte in weiterführenden Versuchen geklärt werden. So sind z.B. Studien denkbar, die die maternale Immunitätslage perinatal unter LGG_M-Therapie untersuchen und somit etwa eine intrauterine Einflussnahme aufzeigen könnten.

Welche Substanz im LGG_M die Wirkungen verursacht, konnte insoweit geklärt werden, als dass es sich nicht um CpG-DNA, sondern um eine proteinasesensible Substanz handelt. Es bleibt das Ziel weiterer Studien zu klären, um welche Substanz es sich genau handelt. So könnten weitere Versuche z.B. die Größe und vielleicht sogar die Struktur des bzw. der

Wirkstoffe aufzeigen. Somit wäre der Weg geebnet, ein natürliches Pharmakon zu produzieren, welches ohne möglicherweise pathogen wirksame Bestandteile Müttern während der Schwangerschaft z.B. als Nahrungsergänzung angeboten werden kann, um eine protektive Einflussnahme auf die Entwicklung von Allergien in den Kindern zu nehmen.

5. Literaturverzeichnis

- Akdis M, Verhagen J, Taylor A. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199: 1567-1575
- Anonymous. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 351 (9111):1225-1232, 1998.
- An H., H. Xu, Y. Yu, M. Zhang, R. Qi, X. Yan, S. Liu, W. Wang, Z. Guo, Z. Qin, and X. Cao. Up-regulation of TLR9 gene expression by LPS in mouse macrophages via activation of NF-kappaB, ERK and p38 MAPK signal pathways. *Immunol Lett* 81 (3):165-169, 2002.
- Bauer S., D. Hangel, and P. Yu. Immunobiology of toll-like receptors in allergic disease. *Immunobiology* 212 (6):521-533, 2007.
- Blumer N., S. Sel, S. Virna, C. C. Patrascan, S. Zimmermann, U. Herz, A. Rühl, H. Renz, and H. Garn. Perinatal maternal application of *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. *Clin Exp Allergy* 37 (3):348-357, 2007.
- Blumer N., U. Herz, M. Wegmann, and H. Renz. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 35 (3):397-402, 2005.
- Boyle RJ., M.L.K. Tang. Can allergic diseases be prevented prenatally? *Allergy* 60: 1423-1431, 2006
- Braun-Fahrlander C., M. Gassner, L. Grize, J.C. Vuille, B. Wuthrich. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmers children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 29, 28-34, 1999
- Brouwer M. L., S. A. Wolt-Plompen, A. E. Dubois, Heide S. van der, D. F. Jansen, M. A. Hoijer, H. F. Kauffman, and E. J. Duiverman. No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy* 36: 899-906, 2006.
- Burke W., M. Fesinmeyer, K. Reed, L. Hampson, and C. Carlsten. Family history as a predictor of asthma risk. *Am J Prev Med* 24 (2):160-169, 2003.
- Cieslewicz G., A. Tomkinson, A. Adler, C. Duez, J. Schwarze, K. Takeda, K. A. Larson, J. J. Lee, C. G. Irvin, and E. W. Gelfand. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. *J Clin Invest* 104:301-308, 1999.

- Constant S. L. and Bottomly K.. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15:297-322, 1997.
- Cousins D. J., T. H. Lee, and D. Z. Staynov. Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines. *J Immunol* 169 (5):2498-2506, 2002.
- Crimi E., Spanevello A., Neri M., Ind P.W., Rossi G. A., Brusasco V. Dissoaciation between Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Allergic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 4-9, 1998
- Dicke T. Rolle von Zytokinen der Interleukin-10-Familie bei der Pathogenese allergischer Entzündungsreaktionen. Universitätsbibliothek Marburg, 2005.
- Duren-Schmidt K., J. Pichler, C. Ebner, P. Bartmann, E. Forster, R. Urbanek, and Z. Szepefalusi. Prenatal contact with inhalant allergens. *Pediatr.Res.* 41: 128-131, 1997.
- Ekerfelt C., L. Matthiesen, G. Berg, and J. Ernerudh. Th2-deviation of fetus-specific T cells. *Immunol Today* 20: 534, 1999.
- Elkord E.. Role of regulatory T cells in allergy: implications for therapeutic strategy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 5: 211-217, 2006.
- Feleszko W., J. Jaworska, R. D. Rha, S. Steinhausen, A. Avagyan, A. Jaudszus, B. Ahrens, D. A. Groneberg, U. Wahn, and E. Hamelmann. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 37: 498-505, 2007.
- Firestein G. S., W. D. Roeder, J. A. Laxer, K. S. Townsend, C. T. Weaver, J. T. Hom, J. Linton, B. E. Torbett, and A. L. Glasebrook. A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* 143: 518-525, 1989.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 66:365-78. 1989
- Galli S. J., S. Nakae, and M. Tsai. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:135-142, 2005.
- Garn H., H. Renz. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology* 212: 441-452, 2007
- Gell P. and R.A. Coombs, The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell Science, 1963
- Gleich G. J.. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 105: 651-663, 2000.
- Goldmann M., Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders. *Clinical and Experimental Immunology* 147: 208-216, 2007.

- Gurish M. F. and Austen K. F.. The diverse roles of mast cells. *J Exp Med* 194: F1-F5, 2001.
- Hagendorens M. M., D. G. Ebo, C. H. Bridts, Water L. Van de, L. S. De Clerck, and W. J. Stevens. Prenatal exposure to house dust mite allergen (Der p 1), cord blood T cell phenotype and cytokine production and atopic dermatitis during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol* 15: 308-315, 2004.
- Heinrich J., B. Hoelscher, C. Frye, I. Meyer, M. Wjst, H. E. Wichmann. Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. *Eur Respir J* 19: 1040-1046, 2002.
- Heinrich J., M. A. Popescu, M. Wjst, I. F. Goldstein, and H. E. Wichmann. Atopy in children and parental social class. *Am J Public Health* 88: 1319-1324, 1998.
- Helin T., S. Haahtela, and T. Haahtela. No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy* 57: 243-246, 2002.
- Herz U., U. Lumpp, A. Daser, E. W. Gelfand, and H. Renz. Murine animal models to study the central role of T cells in immediate-type hypersensitivity responses. *Adv. Exp Med Biol.* 409:25-32, 1996.
- Herz U., U. Lumpp, J. C. Da Palma, K. Enssle, K. Takatsu, N. Schnoy, A. Daser, E. Kottgen, U. Wahn, and H. Renz. The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma. *Immunol Cell Biol.* 74: 209-217, 1996.
- Hogan S. P., A. Koskinen, and P. S. Foster. Interleukin-5 and eosinophils induce airway damage and bronchial hyperreactivity during allergic airway inflammation in BALB/c mice. *Immunol Cell Biol* 75: 284-288, 1997.
- Holloway J. A., J. O. Warner, G. H. Vance, N. D. Diaper, J. A. Warner, and C. A. Jones. Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood. *Lancet* 356: 1900-1902, 2000.
- Horner A. A., J. H. Van Uden, J. M. Zubeldia, D. Broide, and E. Raz. DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease. *Immunol Rev* 179:102-118, 2001.
- Horner A. A.. Toll-like receptor ligands and atopy: a coin with at least two sides. *J Allergy Clin Immunol* 117: 133-1140, 2006.
- Hsieh C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra, and K. M. Murphy. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260: 547-549, 1993.
- Huber B.. [100 years of allergy: Clemens von Pirquet - his idea of allergy and its immanent concept of disease]. *Wien.Klin.Wochenschr.* 118: 573-579, 2006.

- Iliev I. D., H. Kitazawa, T. Shimosato, S. Katoh, H. Morita, F. He, M. Hosoda, and T. Saito. Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cell Microbiol* 7: 403-414, 2005.
- Jarrett E. E. and Hall E.. The development of IgE-suppressive immunocompetence in young animals: influence of exposure to antigen in the presence or absence of maternal immunity. *Immunology* 53: 365-373, 1984.
- Jenmalm M. C., P. G. Holt, and B. Bjorksten. Maternal influence on IgG subclass antibodies to Bet v 1 during the first 18 months of life as detected with a sensitive ELISA. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 175-184, 1997.
- Kaisho T. and Akira S.. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117: 979-987, 2006.
- Kalinski P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20: 561-567, 1999.
- Kalliomaki M., S. Salminen, H. Arvilommi, P. Kero, P. Koskinen, and E. Isolauri. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 357: 1076-1079, 2001.
- Kalliomaki M., S. Salminen, T. Poussa, H. Arvilommi, E. Isolauri. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 361: 1869-1871, 2003
- Kidd P. Th1/Th2 Balance: The hypothesis, its limitations and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8: 223-246, 2003.
- Kilpelainen M., E.O.Terho, H. Helenius, M. Koskenvuo. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin. Exp. Allergy* 30: 201-208, 2000
- Krieg A. M.. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu.Rev Immunol* 20:709-760, 2002.
- Lambrecht B. N.. Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Curr.Opin.Allergy Clin Immunol* 1: 51-59, 2001.
- Larche M., Akdis C., Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 6: 761-771, 2006.
- Lauener R. P., T. Birchler, J. Adamski, C. Braun-Fahrlander, A. Bufe, U. Herz, E. von Mutius, D. Nowak, J. Riedler, M. Waser, F.H. Sennhauser. Expression of CD 14 and toll-like-receptor 2 in farmers and non-farmers children. *Lancet* 360: 465-466, 2002.
- Leckie M. J., A. ten Brinke, J. Khan, Z. Diamant, B. J. O'Connor, C. M. Walls, A. K. Mathur, H. C. Cowley, K. F. Chung, R. Djukanovic, T. T. Hansel, S. T. Holgate, P.

- J. Sterk, and P. J. Barnes. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356: 2144-2148, 2000.
- Lehmann I., A. Thoenelke, M. Weiss, U. Schlink, R. Schulz, U. Diez, G. Sierig, F. Emmrich, B. Jacob, P. Belcredi, G. Bolte, J. Heinrich, O. Herbarth, H. E. Wichmann, and M. Borte. T cell reactivity in neonates from an East and a West German city--results of the LISA study. *Allergy* 57 : 129-136, 2002.
- Li J., H. Saito, L. Crawford, M. D. Inman, M. M. Cyr, and J. A. Denburg. Haemopoietic mechanisms in murine allergic upper and lower airway inflammation. *Immunology* 114: 386-396, 2005.
- Majamaa H. and Isolauri E.. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 99:179-185, 1997.
- Makela M. J., A. Kanehiro, L. Borish, A. Dakhama, J. Loader, A. Joetham, Z. Xing, M. Jordana, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand. IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 6007-6012, 2000.
- Matsuguchi T., A. Takagi, T. Matsuzaki, M. Nagaoka, K. Ishikawa, T. Yokokura, and Y. Yoshikai. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn.Lab Immunol* 10 : 259-266, 2003.
- Maziak W., T. Behrens, T. M. Brasky, H. Duhme, P. Rzehak, S. K. Weiland, and U. Keil. Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany. *Allergy* 58: 572-579, 2003.
- Mellor A. L. and Munn D. H.. Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annu.Rev Immunol* 18:367-391, 2000.
- Miller R. L., G. L. Chew, C. A. Bell, S. A. Biedermann, M. Aggarwal, P. L. Kinney, W. Y. Tsai, R. M. Whyatt, F. P. Perera, and J. G. Ford. Prenatal exposure, maternal sensitization, and sensitization in utero to indoor allergens in an inner-city cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 995-1001, 2001.
- Nowak D., J. Heinrich, R. Jorres, G. Wassmer, J. Berger, E. Beck, S. Boczor, M. Claussen, H.E. Wichmann, H. Magnussen. Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany. *Eur. Respir. J.*): 2541-2552, 1996
- Paul W. E. and Seder R. A.. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251, 1994.
- Pena J. A. and J. Versalovic. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol.* 5:277-285, 2003.

- Pierkes M., I. Bellinghausen, T. Hultsch, G. Metz, J. Knop, and J. Saloga. Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells. *J Allergy Clin Immunol* 103:326-332, 1999.
- Pohjavuori E., M. Viljanen, R. Korpela, M. Kuitunen, M. Tiittanen, O. Vaarala, and E. Savilahti. Lactobacillus GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 114:131-136, 2004.
- Prescott S. L., P. G. Holt, M. Jenmalm, and B. Bjorksten. Effects of maternal allergen-specific IgG in cord blood on early postnatal development of allergen-specific T-cell immunity. *Allergy* 55:470-475, 2000.
- Prescott S. L. and B. Bjorksten. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 120:255-262, 2007.
- Raghupathy R.. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18:478-482, 1997.
- Renz H., K. Bradley, G. L. Larsen, C. McCall, and E. W. Gelfand. Comparison of the allergenicity of ovalbumin and ovalbumin peptide 323-339. Differential expansion of V beta-expressing T cell populations. *J Immunol* 151:7206-7213, 1993.
- Riedler J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch, D. Carr, R. Schierl, D. Nowak, and E. von Mutius. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358:1129-1133, 2001.
- Robinson D. S.. Th-2 cytokines in allergic disease. *Br.Med Bull.* 56:956-968, 2000.
- Robinson D. S., M. Larche, and S. R. Durham. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest* 114:1389-1397, 2004.
- Romagnani S.. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 36:1357-1366, 2006.
- Romagnani S., The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 12: 352-363, 2004.
- Rook G. A. W., E. Hamelmann, L. Brunet. Mycobacteria and allergies. *Immunobiology* 212: 461-473, 2007.
- Rosenfeldt V., E. Benfeldt, S. D. Nielsen, K. F. Michaelsen, D. L. Jeppesen, N. H. Valerius, and A. Paerregaard. Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 111:389-395, 2003.
- Rosenwasser L.. New insights into the pathophysiology of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc.* 28:10-15, 2007.

- Ruiz R. G., D. M. Kemeny, and J. F. Price. Higher risk of infantile atopic dermatitis from maternal atopy than from paternal atopy. *Clin Exp Allergy* 22:762-766, 1992.
- Schneider H., A. Malek, R. Sager, Transfer von Immunglobulinen durch die menschliche Plazenta, *PerinatalMedizin* 9:37-39, 1997
- Seder R. A. and Paul W. E.. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu.Rev Immunol* 12:635-673, 1994.
- Simon D., L. R. Braathen, and H. U. Simon. [Anti-interleukin-5 therapy for eosinophilic diseases]. *Hautarzt* 58:122, 124-122, 127, 2007.
- Simons F.E., Y. Shikishima, G. Van Nest, J.J. Eiden, K.T. HayGlass. Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 1144-1151, 2004
- Smart J. M., E. Horak, A. S. Kemp, C. F. Robertson, and M. L. Tang. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: resolution of asthma is associated with normalization of IFN-gamma responses. *J Allergy Clin Immunol* 110:450-456, 2002.
- Smith D. H., D. C. Malone, K. A. Lawson, L. J. Okamoto, C. Battista, and W. B. Saunders. A national estimate of the economic costs of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156 :787-793, 1997.
- Strachan D.P.. Hay fever, hygiene and household size. *Br. Med. J.* 299: 1259-1260, 1989
- Szepfalusi Z., C. Loibichler, J. Pichler, K. Reisenberger, C. Ebner, and R. Urbanek. Direct evidence for transplacental allergen transfer. *Pediatr.Res.* 48: 404-407, 2000.
- Szepfalusi Z., C. Loibichler, S. Hanel-Dekan, E. Dehlink, M. Gerstmayr, J. Pichler, T. Eiwegger, R. Horvat, and R. Urbanek. Most of diaplacentally transferred allergen is retained in the placenta. *Clin Exp Allergy* 36:1130-1137, 2006.
- Tan G. H., C. C. Wang, F. Y. Huang, H. Wang, Y. H. Huang, and Y. Y. Lin. Active immunotherapy of allergic asthma with a recombinant human interleukin-5 protein as vaccine in a murine model. *Chin Med J (Engl.)* 120:1517-1522, 2007.
- Tang M. L., J. Coleman, and A. S. Kemp. Interleukin-4 and interferon-gamma production in atopic and non-atopic children with asthma. *Clin Exp Allergy* 25:515-521, 1995.
- Taylor A., Verhagen J., Akdis C.A., Akdis M.. T Regulatory Cells in Allergy and Health: A Question of Allergen Specificity and Balance. *Allergy and Immunology* 135: 73-82, 2004.
- Teixeira L. K., B. P. Fonseca, B. A. Barboza, and J. P. Viola. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1:137-144, 2005.

- Tse K. and Horner A. A.. Update on toll-like receptor-directed therapies for human disease. *Ann.Rheum.Dis.* 66 Suppl 3:iii77-iii80, 2007.
- Vance G. H., K. E. Grimshaw, R. Briggs, S. A. Lewis, M. A. Mullee, C. A. Thornton, and J. O. Warner. Serum ovalbumin-specific immunoglobulin G responses during pregnancy reflect maternal intake of dietary egg and relate to the development of allergy in early infancy. *Clin Exp Allergy* 34:1855-1861, 2004.
- Vandenbulcke L., C. Bachert, P. van Cauwenberge, S. Claeys. The Innate Immune System and its Role in Allergic Disorders. *Allergy Immunol* 139: 159-165, 2006.
- Von Ehrenstein O.S., E. Von Mutius, S. Illi, L. Baumann, O. Bohm, R. von Kries. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin. Exp. Allergy* 30: 187-193, 2000.
- Von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis – The epidemiological evidence. *Immunobiology* 212: 433-439, 2007.
- Von Mutius E., N. Pearce, Beasley R., Cheng S., von Ehrenstein O., Bjorksten B., Weiland S. International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis and eczema. *Thorax* 55: 449-453, 2000.
- Wagner H., Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* 14: 499-502, 2001.
- Wang M. F., H. C. Lin, Y. Y. Wang, and C. H. Hsu. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr.Allergy Immunol* 15:152-158, 2004.
- Warner J. A., C. A. Jones, A. C. Jones, and J. O. Warner. Prenatal origins of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 105:S493-S498, 2000.
- Warner J. A. and Warner J. O.. Early life events in allergic sensitisation. *Br.Med Bull.* 56:883-893, 2000.
- Wills-Karp M., J. Santeliz, CL. Karp. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat. Rev Immunol* 1: 69-75, 2001.
- Woodcock A., LA Lowe, CS Murray, BM Simpson, SD Pipis, P Kissen. Early life environmental control: effect on symptoms, sensitization and lung function at age 3 years. *AM J Respir Crit Care Med* 170: 433-439, 2004
- Yan F., H. Cao, T. L. Cover, R. Whitehead, M. K. Washington, and D. B. Polk. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 132 :562-575, 2007.
- Yang X., S. Wang, Y. Fan, and X. Han. IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction. *Eur.J Immunol* 30 :382-391, 2000.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BALB	Bagg Albino
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy DNA
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fc	Fragment crystalline
FCS	Fetales Kälber Serum
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human Leukocyte Antigen
i.p.	Intraperitoneal
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LGG	Lactobacillus rhamnosus GG
LGG _M	Lactobacillus rhamnosus GG-konditioniertes Medium
LGG _{M/ØDNA}	DNA-befreites LGG _M
LGG _{M/ØProtein}	Protein-befreites LGG _M
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	Messenger RNA
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
prim.	primär
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subcutan
sek.	sekundär
TBE	Tris-borate-EDTA
TCR	T-Zell Rezeptor
TH ₁	T-Helfer 1-Zelle
TH ₂	T-Helfer 2-Zelle

TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
T _{Reg}	T-Regulatorische Zellen
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Ein-Jahres-Prävalenz asthmatischer Symptome in 13-14-jährigen Jugendlichen	08
Abbildung 2: Bildung und Funktion der TH-Zellen	11
Abbildung 3: Sensibilisierung und Entwicklung spezifischer B- und TH-Lymphozyten	12
Abbildung 4: Reaktion vom Soforttyp	13
Abbildung 5: Reaktion vom Spättyp	14
Abbildung 6: Behandlungseffekt von LGG bei atopischem Ekzem	19
Abbildung 7: Erfolgreiche Wirkung einer oralen LGG-Behandlung	20
Abbildung 8: Protokoll der LGG _M -Applikation der BALB/c Weibchen	24
Abbildung 9: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung und Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung in den Nachkommen	25
Abbildung 10: Aufbau des Head-out Body-Plethysmographen	27
Abbildung 11: OVA-spezifische Immunglobulintiter im Serum der Nachkommen	45
Abbildung 12: Leukozytenpopulation in der BAL	46
Abbildung 13: IL-5-Konzentration in der BAL	47
Abbildung 14: Repräsentative Darstellung von HE-gefärbten Lungenschnittpräparaten	48
Abbildung 15: Repräsentative Darstellung von PAS-gefärbten Lungenschnittpräparaten	49
Abbildung 16: Lungenfunktion der Nachkommen	50
Abbildung 17: Mittels ELISA bestimmte Zytokinproduktion von restimulierten MNCs der Milzen	51
Abbildung 18: Zytokinproduktion der Makrophagen nach 24-stündiger Inkubation	52
Abbildung 19: Kontrolle des enzymatischen Abbaus der DNA durch Behandlung mit DNase	53
Abbildung 20: Produktion von IL-10 (A) und TNF- α (B) durch RAW-Makrophagen nach Stimulation mit LGG _M und LGG _{M/ØDNA}	54
Abbildung 21: Nachweis der effektiven Proteinase-Behandlung des LGG _M	55
Abbildung 22: TNF- α (A) und IL10-Freisetzung von RAW-Makrophagen (B) nach Behandlung mit LGG _{M/Øprotein} und LGG _M	56
Abbildung 23: Einfluß von LGG _{M/Øprotein} auf die Zytokin-Genexpression von RAW-Makrophagen	57

Tabelle 1:	TLRs mit den jeweils spezifischen PAMPs	16
Tabelle 2:	SDS-Gel (10%)	39
Tabelle 3:	Primerdaten für die PCR	43

8. Zusammenfassung

Unter Allergie wird eine Dysregulation des Immunsystems verstanden, bei der es zu pathologischen immunologischen Reaktionen, wie z.B. Rhinokonjunktiviten, Pruritus oder gar Asthma bronchiale, gegen normalerweise harmlose Antigene kommt. Allergien zählen heute zu den häufigsten und volkswirtschaftlich wichtigsten Erkrankungen Europas, insbesondere auch deshalb, da gerade Kinder und Jugendliche häufig betroffen sind. Es ist also auch von größtem sozioökonomischem Interesse, nach neuen Möglichkeiten zur Prävention und Therapie dieser Erkrankungen zu suchen.

Die Forschung beschäftigt sich aktuell unter anderem mit den prä- und frühen postnatalen Einflüssen auf die Entstehung von Allergien. So sollte die vorliegende Arbeit untersuchen, wie eine gezielte Ernährung mit Zellkulturüberständen von *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG_M) während der Schwangerschaft die Toleranzmechanismen gegenüber Allergenen in den Nachkommen beeinflussen kann.

Im Mausmodell konnte dabei gezeigt werden, dass bei den Nachkommen der perinatal mit LGG_M behandelten Muttertiere einige für allergische Reaktionen in der Lunge typische Charakteristika signifikant vermindert wurden. So wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere peribronchiale Infiltration durch eosinophile Granulozyten beobachtet. Auch konnte eine Abschwächung einer TH₂- zugunsten einer stärker TH₁ gewichteten Immunantwort aufgezeigt werden. Keine Unterschiede wurden aber bei den Konzentrationen an OVA-spezifischen Immunglobulinen gemessen, sodass insgesamt festzuhalten bleibt, dass eine Therapie mit LGG_M zwar die Manifestation einer Allergie abschwächt, die Sensibilisierung als Grundstein in der Pathogenese aber hierdurch nicht verhindert wird.

In vitro-Untersuchungen zur Differenzierung therapeutisch wirksamer Bestandteile des LGG_M mit einer Makrophagenzelllinie zeigten, dass nicht DNA-Bestandteile, sondern Proteinase-sensible Moleküle für die immunregulatorischen Effekte verantwortlich zu sein scheinen. Im Hinblick auf die Möglichkeit, ein natürliches Pharmakon als Nahrungsergänzung für Schwangere herzustellen, das weitgehend befreit von potentiell pathogen wirksamen Bestandteilen des gesamten Bakteriums sein sollte, bleibt es das Ziel weiterführender Studien zu klären, welche Substanz(en) des LGG_M genau für die immunmodulatorisch wirksamen Effekte verantwortlich ist/sind.

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Marburg: Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Daut, Feuser, Garn, Gotzen, Gudermann, Hertl, Klenk, Kann, Koolmann, Kroll, Lill, Lohhoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Rausch, Renz, Röper, Rothmund, Schäfer, Seifart, Steiniger, Vogelmeier, Weihe, Werner, Westermann

in Bad Wildungen: Heuser, Jonas, Rommelfanger

10. Curriculum vitae

Marcel Hennen,

geb. am 28.11.1981 in Leverkusen

Siemensstrasse 60

40217 Düsseldorf

Schulausbildung

1988 – 1992	Gemeinschaftsgrundschule Morsbroicher Strasse Leverkusen
1992 – 2001	Freiherr-von-Stein Gymnasium Leverkusen (Abschluss Abitur 2001)

Zivildienst

2001 – 2002	Zivildienst im Pflegebereich (Klinikum Leverkusen, Onkologie)
-------------	--

Studium

2002 – 2007	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
	- Ärztliche Vorprüfung (Herbst 2004)
2007- 2008	Praktisches Jahr (Wahlfach: Urologie)
	- Asklepios Stadtklinik Bad Wildungen (Ärztl. Direktor: Herr Dr. M. Rommelfanger)
November 2008	- 2. Ärztliche Prüfung - Approbation

Sprachkenntnisse

- Englisch (in Wort und Schrift)
- Spanisch (in Wort und Schrift)

Marburg,

11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Harald Renz durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Renz möchte ich für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Institut durchführen zu können danken.

Vielen Dank an Frau Nicole Blümer, Herrn Holger Garn und Herrn Michael Wegmann für die ständige Diskussionsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die intensive Betreuung, die zur Durchführung und zur Niederschrift dieser Arbeit in erheblichem Maß beigetragen hat.

Frau Anja Spieß, Frau Brigitte Auffahrt, Frau Steffi Achenbach, Herrn Andreas Hildenberg, und Herrn Thomas Ruppertsberg möchte ich für die ausgezeichnete technische Unterstützung danken, ohne die eine solche tierexperimentelle Arbeit kaum hätte durchgeführt werden können.

Herrn Ali Önder Yildirim möchte ich für die exzellente technische Unterstützung bei der Ausarbeitung der histologischen Präparate danken.

Ein besonderes Dankeschön auch an Frau Dr. Dr. Petra Pfefferle. Sie hat durch ihre konstruktive Kritik im besonderen Maße an der Fertigstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit beigetragen.

Genauso möchte ich mich bei den übrigen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern des Instituts danken.

Meinen Freunden Björn Gerhardt, Tae-Min Cho, Gerrit Montag und Erich Buss danke ich für die notwendige Unterstützung, die mir während der Arbeit so manchmal nötig war.

Und schließlich möchte ich mich bei Familie Rühl und meiner Familie und natürlich meiner Patnerin Anika Rühl, die mich stets unterstützt haben und ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre, herzlich bedanken.

DANKE!

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Regulatorische Einflüsse probiotischer Bakterien auf allergische Immunantworten*“ im Institut für Klinische Chemie und molekulare Diagnostik unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Renz mit Unterstützung durch Herrn PD Dr. H. Garn ohne sonstige Hilfsmittel selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere als Dissertation vorgelegt.

Marburg,